



(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :  A61K 38/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/43657  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Oktober 1998 (08.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01507  (22) Internationales Anmeldedatum: 16. März 1998 (16.03.98)		(74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH; D-64271 Darmstadt (DE).	
(30) Prioritätsdaten: 197 13 001.1 27. März 1997 (27.03.97) DE		(81) Bestimmungsstaaten: HU, JP, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KAHLERT, Helga [DE/DE]; Walddörferstrasse 59, D-22041 Hamburg (DE). STÜWE, Hans-Thomas [DE/DE]; Ashausener Strasse 47, D-21435 Stelle (DE). FIEBIG, Helmut [DE/DE]; Bäckerweg 10, D-21493 Schwarzenbek (DE). CROMWELL, Oliver [DE/DE]; Lönshöhe 2, D-21465 Wentorf (DE). BECKER, Wolf-Meinhard [DE/DE]; Dorfstrasse 53, D-23975 Mözen (DE). BUFE, Albrecht [DE/DE]; Ottersbekallee 21, D-20255 Hamburg (DE). SCHRAMM, Gabriele [DE/DE]; Ahornweg 10, D-23867 Sülfeld (DE). JÄGER, Lothar [DE/DE]; R.-Luxemburg-Strasse 34, D-07743 Jena (DE). MÜLLER, Wolf-Dieter [DE/DE]; Brandströmstrasse 17, D-07749 Jena (DE).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: GRAMINAE POLLEN ALLERGEN MUTANTS FOR SPECIFIC IMMUNOTHERAPY, AND PRODUCTION AND USE OF THE SAME			
(54) Bezeichnung: GRAMINAENPOLLENALLERGENMUTANTEN ZUR SPEZIFISCHEN IMMUNTHERAPIE, DEREN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to modified recombinant allergen mutants which can be obtained from recombinant allergens derived from allergens obtained by means of extraction from natural raw materials, such as the pollen of the species <i>Phelum pratense</i>. These modified recombinant allergens stimulate the lymphocytes of persons suffering from a pollen allergy to bring about proliferation and cytokine synthesis, but have a significantly reduced capacity to bond with the IgE antibodies contained in the serum of lymphocyte donors and with grass pollen allergen specific IgEs. The inventive modified recombinant allergens can therefore be used for a specific, individual allergy treatment.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft modifizierte rekombinante Allergenmutanten, die aus rekombinanten Allergenen, abgeleitet von Allergenen, die durch Extraktion aus natürlichen Rohstoffen, wie z.B. Pollen der Spezies <i>Phleum pratense</i> gewonnen werden können. Diese modifizierten rekombinanten Allergene stimulieren Lymphozyten von Pollenallergikern zur Proliferation und Zytokinsynthese, weisen jedoch mit den im Serum der T-Lymphozytenspender enthaltenen IgE-Antikörper sowie mit Graspollenallergen-spezifischen IgE eine deutlich verminderte Bindungsfähigkeit auf und sind daher für eine spezifische, maßgeschneiderte Allergie-Therapie verwendbar.</p>			

#### ***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

**Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.**

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Maurenien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänen		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

## Gramina npollenallergenmutanten zur spezifischen Immuntherapie, deren Herstellung und Verwendung

Die Erfindung betrifft modifizierte rekombinante Allergene (mrA), abgeleitet von Allergenen, die durch Extraktion aus natürlichen Rohstoffen gewonnen werden können. Als natürlicher Rohstoff dienen Pollenkörner der Graminaen, wie z.B. *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Cynodon dactylon*, *Holcus lanatus* u.a. .

Graminaenpollenextrakte, wie sie für diagnostischen und therapeutischen Einsatz verwendet werden, bestehen aus einem heterogenen Gemisch von Proteinen und Glykoproteinen, unter denen einige mit IgE-Antikörpern von Allergikern reagieren und definitionsgemäß als Allergene bezeichnet werden. Die molekularen Eigenschaften erlauben eine Klassifizierung in 6 Gruppen, wobei die Kreuzreaktivität der in Frage kommenden Graminaen-Spezies relativ hoch ist. Die dominierenden Allergengruppen (Hauptallergene) sind die Gruppen 5 und 1, gemäß der üblichen Allergenklassifizierung (Liebers et al., *Clin. Exper. Allergy*, 26, 494-516 (1996)). Die N-terminalen Aminosäuresequenzen und/oder die partiellen oder vollständigen deduzierten Aminosäuresequenzen der Gruppen 5 und 1 der Hauptallergene sind bekannt (Vrtala et al., *J. Immunology* 151, 4773-4781 (1993) u. Bufe et al. *FEBS. Lett.* 263, 6-12 (1995)). Weiterhin gibt es beschriebene Verfahren zur Klonierung dieser Hauptallergene (Scheiner et al. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 98, 93-96 (1992)).

Gegenwärtig werden zur In-vitro-Diagnostik von Typ 1-Allergien wäßrige Extrakte aus Graminaenpollen verwendet. Diese Extrakte sind auch die Basis für die In-vitro-Diagnostik und zur anschließenden spezifischen Immuntherapie (Fiebig H., *Allergo Journal* 7, 377-382 (1995)). Der Einsatz von nativen Allergenextrakten zur spezifischen Immuntherapie wird durch die dabei induzierten IgE-bedingten, allergischen Reaktionen (Nebenreaktionen) begrenzt. Deshalb können native Allergenextrakte nur in Dosierungen unterhalb der Nebenwirkungsschwelle appliziert werden. Um die für den therapeutischen Effekt notwendigen hohen Allergenkonzentrationen zu erreichen, werden die Extrakte durch mehrfache aufeinanderfolgende Injektionen mit einer bis zur Erhaltungsdosis

ansteigenden Konzentration verabreicht. Durch Adsorption an Gele ist es möglich, Allergenextrakte nebenwirkungsärmer und effektiver zur Hyposensibilisierung zu verwenden.

5 Eine weitere Verbesserung konnte durch die chemische Modifizierung der Allergene zu Allergoiden, die eine verringerte IgE-Reaktivität bei weitgehend erhaltener Immunogenität besitzen, erzielt werden (Fiebig H., Allergo Journal 7, 377-382 (1995) u. Maasch et al. Clin. Ref. Allergy 5, 89-106 (1987)).

10 In ersten Untersuchungen mit Hausstaubmilbenallergenen gibt es Hinweise, daß durch gerichteten Aminosäureaustausch eine Reduzierung der IgE-Reaktivität erzielt werden kann (Smith et al. Mol. Immunol. 33, 399-405 (1996) u. Nishiyama et al. Mol. Immunol. 32, 1021-1029 (1995)).

15 Die etablierte Hyposensibilisierung von Graminaenpollenallergikern erfolgt momentan mit natürlichen Extrakten, die alle bekannten Allergene sowie nichtallergene, aber immunogene Begleitstoffe in beträchtlichen Konzentrationen enthalten, obwohl für die allergenspezifische Therapie 20 nur diejenigen Allergenmoleküle benötigt werden, gegen die der jeweilige Patient tatsächlich sensibilisiert ist. Das bedeutet, daß der Allergiker zwangsläufig mit Komponenten behandelt wird, die nicht zu seiner Hypo- sensibilisierung beitragen und Nebenwirkungen induzieren können.

25 Durch die Verfügbarkeit von modifizierten rekombinanten Allergenen können einzelne Allergene oder definierte Gemische für die Hyposensibilisierung entsprechend dem individuellen Sensibilisierungsspektrum als Arzneimittel eingesetzt werden.

30 Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer spezifischen, maßgeschneiderten Therapie.

35 Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, neue Verbindungen mit wertvollen Eigenschaften aufzufinden, insbesondere solche, die zur Herstellung von Arzneimitteln verwendet werden können.

Es wurde gefunden, daß die Verbindungen der vorliegenden Erfindung in Form der modifizierten rekombinanten Allergene sowie ihre Salze und Solvate bei guter Verträglichkeit sehr wertvolle pharmakologische Eigenschaften besitzen. Vor allem wirken sie hyposensibilisierend.

5

Die Verbindungen können als Arzneimittelwirkstoffe in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden, insbesondere zur Therapie bei allergischen Erkrankungen und zur Hyposensibilisierung von Allergikern.

10

Überraschenderweise ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung gelungen, ausgehend von rekombinanten Allergenen, die mit den in natürlichen Extrakten vorkommenden Allergenmolekülen hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz identisch sind, durch an sich bekannte gentechnische Verfahren, Mutanten zu konstruieren, die mit T-Lymphozyten von Graspollenallergikern ~~spezifisch~~ reagieren, d.h. zur Proliferation und Zytokinsynthese stimulieren oder eine Anergie induzieren, aber mit den im Serum der T-Lymphozytenspender enthaltenen IgE-Antikörper sowie mit Graspollenallergen-spezifischen IgE aus Seren von anderen Graspollenallergikern eine deutlich verminderte Bindungsfähigkeit aufweisen.

20

Dieser Effekt, der weder bei den natürlich vorkommenden noch bei den rekombinanten Allergenen auftritt, ist deshalb wünschenswert, weil

25

- die IgE-vermittelten Nebenwirkungen bei der Hyposensibilisierung vermieden oder zumindest stark reduziert werden,

30

- die Erkennung der modifizierten rekombinanten Allergene durch die TH-Gedächtnislymphozyten der Allergiker gewährleistet ist,

35

- damit Voraussetzung für die Normalisierung der beim Allergiker gestörten Balance der unterschiedlich differenzierten TH-Subpopulationen gegeben ist,

- die therapeutische Wirkung durch Anergisierung und/oder Eliminierung der allergenreaktiven T-Zellen sowie die funktionelle Umorientierung von einer TH2-dominierten zu einer TH0/TH1-ausgerichteten spezifischen T-Zell-Population möglich wird,

- die Regulation der Immunglobulinsynthese von der für den Allergiker typischen Bildung spez. IgE-Antikörper (TH2-kontrolliert) zur bevorzugten Synthese von IgG-Antikörpern (TH1-kontrolliert) erfolgen kann,
- und dadurch bei einer Behandlung mit den erfindungsgemäßen modifizierten rekombinanten Allergene eine deutliche Verbesserung des Befindens der Patienten zu erwarten ist.

10

15

20

25

30

35

Gegenstand der Erfindung sind modifizierte rekombinante Allergene, abgeleitet von Allergenen, die durch Extraktion aus natürlichen Rohstoffen gewonnen werden. Als natürlicher Rohstoff dienen Pollenkörner der Graminaen, wie z.B. Phleum pratense, Lolium perenne Dactylus glomerata, Poa pratensis, Cynodon dactylon, Holcus lanatus u.a. Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung, modifizierte rekombinante Allergene, die sich von den Hauptallergenen der Gruppen 1-6 ableiten, wobei die Reaktivität dieser erfindungsgemäßen Allergene mit IgE-Antikörpern von Graspollenallergikern eliminiert oder zumindest reduziert ist und die Reaktivität mit den T-Lymphozyten weiterhin erhalten ist. Die modifizierten rekombinanten Allergene unterscheiden sich vom Wildtyp dadurch, daß die Gene der Allergene durch gentechnische Verfahren so modifiziert wurden, daß die von ihnen codierten Polypeptide Austausche, Deletionen und/oder Additionen einzelner oder mehrerer Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Die dominierenden T-Zell-reaktive Bereiche der modifizierten rekombinanten Allergene (T-Zell-Epitope) werden dabei gentechnisch ~~nicht verändert~~.

Vorzugsweise werden die modifizierten rekombinanten Allergene von den Hauptallergenen der Gruppe 5, aber auch von der Gruppe 1 abgeleitet. Insbesondere stammen die erfindungsgemäßen Allergene von dem Hauptallergen Phl p 5b ab.

Die Sequenz von Phl p 5b lautet gemäß dem Einbuchstabencode für Aminosäuren folgendermaßen:

5 ADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEQKLIEDINVGFKAAVAAAASVPAADK  
1 10 20 30 40 50  
FKTFEEAAFTSSSKAAAACAPGLVPKLDAAYSVAYKAAVGATPEAKFDSFV  
51 60 70 80 90 100  
10 ASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGELQIIDKIDAAFKVAA  
101 110 120 130 140 150  
TAAATAPADDKFTVFEAAFNKAIKESTGGAYDTYKCIPSLEAAVKQAYAA  
151 160 170 180 190 200  
15 TVAAAPQVKYAVFEAALTAKITAMSEVQKVSQPATGAATVAAGAATTAAG  
201 210 220 230 240 250  
AASGAATVAAGGYKV  
251 260 265

25 Die Erfindung betrifft insbesondere modifizierte rekombinante Allergene, in denen mindestens einer oder eine Kombinationen der Bereiche 16-42, 135-149 und 180-206 des aus insgesamt 265 Aminosäuren bestehenden Phl p 5b-Polypeptides nicht verändert werden. Die zu erhaltenen Abschnitte sind die T-Zell-Epitop-Bereiche.

30 Die genannten Aminosäurereste können auch derivatisiert sein. Insbesondere kommen hierbei Modifikationen der Seitenketten in Frage.

35 Die vor- und nachstehend aufgeführten Abkürzungen von Aminosäureresten stehen für die Reste folgender Aminosäuren:

	Ala = A	Alanin
	Asn = N	Asparagin
	Asp = D	Asparaginsäure
	Arg = R	Arginin
5	Cys = C	Cystein
	Gln = Q	Glutamin
	Glu = E	Glutaminsäure
	Gly = G	Glycin
	His = H	Histidin
10	Ile = I	Isoleucin
	Leu = L	Leucin
	Lys = K	Lysin
	Met = M	Methionin
	Phe = F	Phenylalanin
15	Pro = P	Prolin
	Ser = S	Serin
	Thr = T	Threonin
	Trp = W	Tryptophan
	Tyr = Y	Tyrosin
20	Val = V	Valin.

Ferner bedeuten nachstehend:

	Ac	Acetyl
25	BOC	tert.-Butoxycarbonyl
	CBZ oder Z	Benzoyloxycarbonyl
	DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
	DMF	Dimethylformamid
	EDCI	N-Ethyl-N,N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid
30	Et	Ethyl
	FCA	Fluoresceincarbonsäure
	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
	Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
	HOEt	1-Hydroxybenzotriazol
35	Me	Methyl
	MBHA	4-Methyl-benzhydrylamin

	Mtr	4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenyl-sulfonyl
	HONSu	N-Hydroxysuccinimid
	OBut	tert.-Butylester
	Oct	Octanoyl
5	OMe	Methylester
	OEt	Ethylester
	POA	Phenoxyacetyl
	Sal	Salicyloyl
	TFA	Trifluoressigsäure
10	Trt	Trityl (Triphenylmethyl).

Sofern die vorstehend genannten Aminosäuren in mehreren enantiomeren Formen auftreten können, so sind vor- und nachstehend alle diese Formen und auch ihre Gemische (z. B. die DL-Formen) eingeschlossen. Ferner 15 können die Aminosäuren, z. B. als Bestandteil von Verbindungen mit entsprechenden an sich bekannten Schutzgruppen versehen sein.

In die erfindungsgemäßen Verbindungen sind auch sogenannte Prodrug-Derivate eingeschlossen, d. h. mit z. B. Alkyl- oder Acylgruppen, Zuckern 20 oder Oligopeptiden abgewandelte Verbindungen der, die im Organismus rasch zu den wirksamen erfindungsgemäßen Verbindungen gespalten werden.

Hierzu gehören auch bioabbaubare Polymerderivate der erfindungsgemäßen Verbindungen, wie dies z. B. in Int. J. Pharm. 115, 61-67 (1995) 25 beschrieben sind.

Die erfindungsgemäßen Allergene können ein oder mehrere chirale Zentren besitzen und daher in verschiedenen stereoisomeren Formen vorkommen. Die vorliegende Erfindung umschließt alle diese Formen.

30 Ganz besonders bevorzugt sind modifizierte rekombinante Allergene, die aus der folgenden Gruppe von Polypeptiden, abgeleitet von Phl p 5b, stammen:

35 PM1 ( $N^{32} \rightarrow D$ ,  $D^{49} \rightarrow L$ ,  $K^{50} \rightarrow A$ )

- 8 -

PM2 ( $D^{49} \rightarrow L$ ,  $K^{50} \rightarrow A$ )  
 PM3 ( $A^{13} \rightarrow C$ )  
 DM1 ( $\Delta K^{50} \rightarrow P^{132}$ ,  $D^{49} \rightarrow L$ )  
 DM 2 ( $\Delta F^{51} - G^{178}$ ,  $D^{49} - L$ ,  $K^{50} - A$ )  
 5 DM2\* ( $\Delta F^{51} - G^{178}$ , 179 - 217 veränderte Sequenz)  
 DM3 ( $\Delta A^{154} - T^{177}$ ,  $A^{220} \rightarrow T$ )

→ In den vorstehenden Sequenzen werden jeweils die modifizierten Aminosäuren bzw. Aminosäuresequenzen angegeben.  
 10

PM1 bedeutet dabei Punktmutation 1 und hat die folgende Sequenz (die ausgetauschten Aminosäure im Vergleich zu Phi p 5b sind fett gedruckt) :

15 ADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDIDVGFKAAVAAAASVPAALA  
 1 10 20 30 40 50  
 FKTFEAAFTSSSKAAAAKAPGLVPKLDAAYSVAYKAAVGATPEAKFDSFV  
 20 51 60 70 80 90 100  
 ASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGELQIIDKIDAAFKVAA  
 101 110 120 130 140 150  
 TAAATAPADDKFTVFEAAFNKAIKESTGGAYDTYKCIPSLEAAVKQAYAA  
 25 151 160 170 180 190 200  
 TVAAAPQVKYAVFEAALT KAITAMSEVQKVSQPATGAATVAAGAATTAAG  
 201 210 220 230 240 250  
 AASGAATVAAGGYKV  
 30 251 260 265

35 Die weiteren besonders bevorzugten Peptide haben die folgenden Sequenzen :

PM2 ( $D^{49} \rightarrow L$ ,  $K^{50} \rightarrow A$ ) :

- 9 -

ADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDINVGFKAAVAAAASVPAALA

1	10	20	30	40	50
5	FKTFEEAFTSSSKAAAACKAPGLVPKLDAAYSVAYKAAVGATPEAKFDSFV				
51	60	70	80	90	100
ASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGELQIIDKIDAAFKVAA					
101	110	120	130	140	150
10	TAAATAPADDKFTVFEAAFNKAIKESTGGAYDTYKCIPSLEAAVKQAYAA				
151	160	170	180	190	200
TVAAAPQVKYAVFEAALTAKITAMSEVQKVSQPATGAATVAAGAATTAAG					
201	210	220	230	240	250
15	AASGAATVAAGGYKV				
251	260	265			

20 PM3 (A<sup>13</sup> → C) :

1	10	20	30	40	50	
ADAGYAPATPAAACGAAAGKATTEEQKLIEDINVGFKAAVAAAASVPAADK						
25	51	60	70	80	90	100
FKTFEEAFTSSSKAAAACKAPGLVPKLDAAYSVAYKAAVGATPEAKFDSFV						
101	110	120	130	140	150	
30	151	160	170	180	190	200
ASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGELQIIDKIDAAFKVAA						
151	160	170	180	190	200	
TAAATAPADDKFTVFEAAFNKAIKESTGGAYDTYKCIPSLEAAVKQAYAA						
201	210	220	230	240	250	
TVAAAPQVKYAVFEAALTAKITAMSEVQKVSQPATGAATVAAGAATTAAG						
35	251	260	265			

- 10 -

DM1 ( $\Delta$  K<sup>50</sup>  $\rightarrow$  P<sup>132</sup>, D<sup>49</sup>  $\rightarrow$  L) :

ADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDINVGFKAAVAAAASVPAALA

5 1 10 20 30 40 50

GELQIIDKIDAAFKVAATAAATAPADDKFTVFEAAFNKAIKESTGGAYDTYK

51 60 70 80 90 100

~ CIPSLEAAVKQAYAATVAAAPQVKYAVFEAALT KAITAMSEVQKV SQPATG

10 103 110 120 130 140 150

AATVAAAGAATTAAGAASGAATVAAGGYKV

154 160 170 180

15 DM 2 ( $\Delta$  F<sup>51</sup> – G<sup>178</sup>, D<sup>49</sup> – L, K<sup>50</sup> - A) :

ADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDINVGFKAAVAAAASVPAALA

20 1 10 20 30 40 50

GAYDTYKCIPSLEAAVKQAYAATVAAAPQVKYAVFEAALT KAITAMSEVQKV

51 60 70 80 90 100

VSQPATGAATVAAAGAATTAAGAASGAATVAAGGYKV

25 102 110 120 130 137

DM2\* ( $\Delta$  F<sup>51</sup> – G<sup>178</sup>, 179 – 217 veränderte Sequenz) :

30 Diese Sequenz entspricht der Sequenz von DM2, wobei zusätzlich die Aminosäuren der Positionen 179 - 217 des Ausgangspeptids Phl p 5b eine veränderte Sequenz aufweisen und alle nachfolgenden Aminosäuren fehlen.

35 DM3 ( $\Delta$  A<sup>154</sup> – T<sup>177</sup>, A<sup>220</sup>  $\rightarrow$  T) :

ADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDINVGFKAAVAAAASVPAADK

1	10	20	30	40	50
5	FKTFEEAAFTSSSKAAAAPGLVPKLDAAYSVAYKAAVGATPEAKFDSFV				
51	60	70	80	90	100
ASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGELQIIDKIDAAFKVAA					
101	110	120	130	140	150
10	TAAGGAYDTYKCIPSLEAAVKQAYAATVAAAPQVKYAVFEAALTKTITAMS				
151	160	170	180	190	200
EVQKVSQPATGAATVAAGAATTAAGAASGAATVAAGGYKV					
15	202	210	220	230	240

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von modifizierten rekombinanten Allergenen durch Verwendung der Polymerase-Ketten-20 Reaktion und/oder ihrer Varianten. Bei bekannter Peptidsequenz können die Allergene auch durch an sich bekannte Methoden zur Peptid-synthese, z. B. den modifizierten Merrifield Techniken hergestellt werden, wie sie in der Literatur (z.B. in den Standardwerken wie Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart;) beschrieben sind, und zwar unter Reaktionsbedingungen, die für die ge-25 nannten Umsetzungen bekannt und geeignet sind. Dabei kann man auch von an sich bekannten, hier nicht näher erwähnten Varianten Gebrauch machen. Ferner ist es möglich, die Peptide aus einem ihrer funktionellen Derivate durch Behandeln mit einem solvolysierenden oder hydrogeno-30 lysierenden Mittel in Freiheit zu setzen, und/oder eine basisches oder saures Peptid durch Behandeln mit einer Säure oder Base in eines ihrer Salze oder Solvate zu überführen.

35 Bevorzugte Ausgangsstoffe für die Solvolyse bzw. Hydrogenolyse sind solche, die anstelle einer oder mehrerer freier Amino- und/oder Hydroxy-

gruppen entsprechende geschützte Amino- und/oder Hydroxygruppen enthalten, vorzugsweise solche, die anstelle eines H-Atoms, das mit einem N-Atom verbunden ist, eine Aminoschutzgruppe tragen, z. B. solche, die anstelle einer NH<sub>2</sub>-Gruppe eine NHR'-Gruppe (worin R' eine 5 Aminoschutzgruppe bedeutet, z. B. BOC oder CBZ) enthalten.

Ferner sind Ausgangsstoffe bevorzugt, die anstelle des H-Atoms einer Hydroxygruppe eine Hydroxyschutzgruppe tragen, z. B. solche, die anstelle einer Hydroxyphenylgruppe eine R''O-phenylgruppe enthalten 10 (worin R'' eine Hydroxyschutzgruppe bedeutet).

Es können auch mehrere - gleiche oder verschiedene - geschützte Amino- und/oder Hydroxygruppen im Molekül des Ausgangsstoffes vorhanden sein. Falls die vorhandenen Schutzgruppen voneinander verschieden sind, 15 können sie in vielen Fällen selektiv abgespalten werden.

Der Ausdruck "Aminoschutzgruppe" ist allgemein bekannt und bezieht sich auf Gruppen, die geeignet sind, eine Aminogruppe vor chemischen Um- 20 setzungen zu schützen (zu blockieren), die aber leicht entfernbare sind, nachdem die gewünschte chemische Reaktion an anderen Stellen des Moleküls durchgeführt worden ist. Typisch für solche Gruppen sind ins- 25 besondere unsubstituierte oder substituierte Acyl-, Aryl-, Aralkoxymethyl- oder Aralkylgruppen. Da die Aminoschutzgruppen nach der gewünschten Reaktion (oder Reaktionsfolge) entfernt werden, ist ihre Art und Größe im übrigen nicht kritisch; bevorzugt werden jedoch solche mit 1-20, insbe- 30 sondere 1-8 C-Atomen. Der Ausdruck "Acylgruppe" ist im Zusammenhang mit dem vorliegenden Verfahren in weitestem Sinne aufzufassen. Er um- schließt von aliphatischen, araliphatischen, aromatischen oder hetero- cyclischen Carbonsäuren oder Sulfonsäuren abgeleitete Acylgruppen sowie 35 insbesondere Alkoxy carbonyl-, Aryloxy carbonyl- und vor allem Aralkoxy carbonylgruppen. Beispiele für derartige Acylgruppen sind Alkanoyl wie Acetyl, Propionyl, Butyryl; Aralkanoyl wie Phenylacetyl; Aroyl wie Benzoyl oder Toluyl; Aryloxy alkanoyl wie POA; Alkoxy carbonyl wie Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl, BOC, 2- Iodethoxycarbonyl; Aralkyloxy carbonyl wie CBZ ("Carbobenzoxy"), 4- 35 Methoxybenzyloxy carbonyl, FMOC; Arylsulfonyl wie Mtr. Bevorzugte

Aminoschutzgruppen sind BOC und Mtr, ferner CBZ, Fmoc, Benzyl und Acetyl.

Der Ausdruck "Hydroxyschutzgruppe" ist ebenfalls allgemein bekannt und bezieht sich auf Gruppen, die geeignet sind, eine Hydroxygruppe vor chemischen Umsetzungen zu schützen, die aber leicht entfernt werden können, nachdem die gewünschte chemische Reaktion an anderen Stellen des Moleküls durchgeführt worden ist. Typisch für solche Gruppen sind die oben genannten unsubstituierten oder substituierten Aryl-, Aralkyl- oder Acylgruppen, ferner auch Alkylgruppen. Die Natur und Größe der Hydroxyschutzgruppen ist nicht kritisch, da sie nach der gewünschten chemischen Reaktion oder Reaktionsfolge wieder entfernt werden; bevorzugt sind Gruppen mit 1-20, insbesondere 1-10 C-Atomen. Beispiele für Hydroxyschutzgruppen sind u.a. Benzyl, p-Nitrobenzoyl, p-Toluolsulfonyl, tert.-Butyl und Acetyl, wobei Benzyl und tert.-Butyl besonders bevorzugt sind. Die COOH-Gruppen in Asparaginsäure und Glutaminsäure werden bevorzugt in Form ihrer tert.-Butylester geschützt (z. B. Asp(OBut)).

Das In-Freiheit-Setzen der Verbindungen aus ihren funktionellen Derivaten gelingt - je nach der benutzten Schutzgruppe - z. B. mit starken Säuren, zweckmäßig mit TFA oder Perchlorsäure, aber auch mit anderen starken anorganischen Säuren wie Salzsäure oder Schwefelsäure, starken organischen Carbonsäuren wie Trichloressigsäure oder Sulfonsäuren wie Benzol- oder p-Toluolsulfonsäure. Die Anwesenheit eines zusätzlichen inerten Lösungsmittels ist möglich, aber nicht immer erforderlich. Als inerte Lösungsmittel eignen sich vorzugsweise organische, beispielsweise Carbonsäuren wie Essigsäure, Ether wie Tetrahydrofuran oder Dioxan, Amide wie DMF, halogenierte Kohlenwasserstoffe wie Dichlormethan, ferner auch Alkohole wie Methanol, Ethanol oder Isopropanol, sowie Wasser. Ferner kommen Gemische der vorgenannten Lösungsmittel in Frage. TFA wird vorzugsweise im Überschuß ohne Zusatz eines weiteren Lösungsmittels verwendet, Perchlorsäure in Form eines Gemisches aus Essigsäure und 70 %iger Perchlorsäure im Verhältnis 9:1. Die Reaktionstemperaturen für die Spaltung liegen zweckmäßig zwischen etwa 0° und 50°, vorzugsweise arbeitet man zwischen 15 und 30° oder Raumtemperatur.

Die Gruppen BOC, OBut und Mtr können z. B. bevorzugt mit TFA in Dichlormethan oder mit etwa 3 bis 5n HCl in Dioxan bei 15-30° abgespalten werden, die Fmoc-Gruppe mit einer etwa 5- bis 50 %igen Lösung von 5 Dimethylamin, Diethylamin oder Piperidin in DMF bei 15-30°.

Die Tritylgruppe wird zum Schutz der Aminosäuren Histidin, Asparagin, Glutamin und Cystein eingesetzt. Die Abspaltung erfolgt, je nach gewünschtem Endprodukt, mit TFA / 10% Thiophenol, wobei die 10 Tritylgruppe von allen genannten Aminosäuren abgespalten wird, bei Einsatz von TFA / Anisol oder TFA / Thioanisol wird nur die Tritylgruppe von His, Asn und Gln abgespalten, wogegen sie an der Cys-Seitenkette verbleibt.

15 Hydrogenolytisch entfernbare Schutzgruppen (z. B. CBZ oder Benzyl) können z. B. durch Behandeln mit Wasserstoff in Gegenwart eines Katalysators (z. B. eines Edelmetallkatalysators wie Palladium, zweckmäßig auf einem Träger wie Kohle) abgespalten werden. Als Lösungsmittel eignen sich dabei die oben angegebenen, insbesondere z. B. Alkohole wie 20 Methanol oder Ethanol oder Amide wie DMF. Die Hydrogenolyse wird in der Regel bei Temperaturen zwischen etwa 0 und 100° und Drucken zwischen etwa 1 und 200 bar, bevorzugt bei 20-30° und 1-10 bar durchgeführt. Eine Hydrogenolyse der CBZ-Gruppe gelingt z. B. gut an 5 bis 10 %igem Pd/C in Methanol oder mit Ammoniumformiat (anstelle von 25 Wasserstoff) an Pd/C in Methanol/DMF bei 20-30°.

Eine Base kann mit einer Säure in das zugehörige Säureadditionssalz übergeführt werden, beispielsweise durch Umsetzung äquivalenter Mengen der Base und der Säure in einem inerten Lösungsmittel wie 30 Ethanol und anschließendes Eindampfen. Für diese Umsetzung kommen insbesondere Säuren in Frage, die physiologisch unbedenkliche Salze liefern. So können anorganische Säuren verwendet werden, z.B. Schwefelsäure, Salpetersäure, Halogenwasserstoffsäuren wie Chlorwasserstoffsäure oder Bromwasserstoffsäure, Phosphorsäuren wie Orthophosphorsäure, Sulfaminsäure, ferner organische Säuren, insbesondere 35 aliphatische, alicyclische, araliphatische, aromatische oder heterocyclische

ein- oder mehrbasige Carbon-, Sulfon- oder Schwefelsäuren, z.B. Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Pivalinsäure, Diethylessigsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Pimelinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Milchsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Citronensäure, Gluconsäure,

5 Ascorbinsäure, Nicotinsäure, Isonicotinsäure, Methan- oder Ethansulfonsäure, Ethandisulfonsäure, 2-Hydroxyethansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Naphthalin-mono- und Disulfonsäuren, Laurylschwefelsäure. Salze mit physiologisch nicht unbedenklichen Säuren, z.B. Pikrate, können zur Isolierung und /oder Aufreinigung der Verbindungen

10 der Formel I verwendet werden.

Andererseits kann eine Säure der Formel I durch Umsetzung mit einer Base in eines ihrer physiologisch unbedenklichen Metall- oder Ammoniumsalze übergeführt werden. Als Salze kommen dabei insbesondere die

15 Natrium-, Kalium-, Magnesium-, Calcium- und Ammoniumsalze in Betracht, ferner substituierte Ammoniumsalze, z. B. die Dimethyl-, Monoethyl-, Diethyl- oder Diisopropylammoniumsalze, Cyclohexyl-, Dicyclohexylammoniumsalze, Dibenzylethylendiammoniumsalze, weiterhin z. B. Salze mit Arginin oder Lysin.

20

Zur Ermittlung der DNA- bzw. Aminosäuresequenzen sind folgende Schritte notwendig:

25 Die allergenen Bestandteile der nach üblichen Verfahren hergestellten Extrakte werden identifiziert und ihre wesentlichen physikochemischen Parameter charakterisiert. Die Identifizierung als Allergen erfolgt durch Nachweis ihrer Bindungsfähigkeit an IgE-Antikörper von Allergikern. In der

30 Regel benutzt man hierzu an sich bekannte Methoden, wie SDS-PAGE, Isoelektrofokussierung und anschließendes Western Blotting mit Seren von Allergikern, wobei die Entwicklung nur der bindenden Antikörper des IgE-Isotyps vorgenommen wird. Es ist dabei zu beachten, daß ausreichend viele Typen von klinisch gesicherten Allergikern (als

35 Mindestanzahl ist hier ein Wert von 20 anzusetzen) verwendet werden.

Alternativ können auch andere Methoden, wie z.B. die CIE oder CRIE eingesetzt werden.

5 Diese so identifizierten und charakterisierten Allergene aus Graminaenpollen können analytisch präpariert werden, so daß eine N-terminale Aminosäurebestimmung möglich ist. Weiterhin können die Allergene biochemisch gereinigt und zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet werden. Diese monoklonalen Antikörper können, ebenso wie die IgE-Antikörper in den Seren von Allergikern, zur 10 immunologischen Identifizierung und Charakterisierung der Allergene aus natürlichen Quellen oder der Moleküle, die durch die Rekombinантentechnik hergestellt werden, benutzt werden.

15 Ausgehend von diesen Informationen über Allergene und den Mitteln zur Identifizierung ist es möglich, die Allergene nach bekannten gentechnischen Verfahren zu klonieren und als rekombinante Allergene zu exprimieren. Die DNA-Klone der nach üblichen Verfahren gewonnenen und charakterisierten rekombinanten Allergene sind die Basis für die gentechnische Modifikation die zu den erfindungsgemäßen modifizierten, 20 rekombinant hergestellten Allergenmolekülen führen.

25 Um die Reaktivität der erfindungsgemäßen modifizierten rekombinanten Allergene zu gewährleisten, ist außerdem die Identifizierung der T-Zell-Epitope erforderlich.

Grundlage hierfür ist die Kenntnis der Aminosäuresequenz der in Frage kommenden Allergene oder die entsprechend zugrundeliegende DNA-Sequenz. Die Aminosäuresequenz wird in der Regel aus der DNA-Sequenz der rekombinanten Allergene deduziert. Im Rahmen dieser 30 Erfindung sind somit zu jeder angegebenen Peptidsequenz auch die zugehörigen DNA-Sequenzen mit eingeschlossen, auch wenn diese nicht explizit offenbart werden, da sie auf bekannte und einfache Weise aus den Peptidsequenzen herleitbar sind.

35 Basierend auf der Aminosäuresequenz wird eine Serie von überlappenden Oligopeptiden nach üblichen Verfahren, wie z.B. Festphasensynthese

nach modifizierten Merrifield-Techniken, hergestellt, wobei die gesamte Sequenz der Allergene abgedeckt wird. Geeignet sind hierbei Oligopeptide mit jeweils 6 - 20, vorzugsweise 9 -15 Aminosäureresten. Ganz besonders geeignet sind Dodecapeptide mit einem Versatz um jeweils 3 Aminosäuren, die überlappend die gesamte Sequenz des jeweiligen Allergens abdecken.

5

~ Zur Identifizierung der T-Zell-Epitope werden von Graminaenpollen-Allergikern T-Zell-Klone durch wiederholte Stimulierung mit dem gereinigten natürlichen oder rekombinant hergestellten in Frage kommenden Allergen nach dem üblichen Verfahren etabliert (Lit.). Hierzu muß eine repräsentative Anzahl von T-Zell-Klonen, die von ausreichend vielen Spendern abstammen, etabliert werden.

10

15 Diese T-Zell-Klone werden mit den oben beschriebenen überlappenden Peptiden inkubiert und deren Fähigkeit, die T-Zellen zur Proliferation zu stimulieren, getestet. Die Proliferation wird durch Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin mit an sich üblichen Verfahren bestimmt. Diejenigen Oligopeptide, die eine ausreichende Proliferation der T-Zell-Klone auslösen, werden als Peptidliganden, die den T-Zell-Epitopen entsprechen, angesehen. Die so bestimmten T-Zell-Epitope dienen zur Festlegung von T-Zell-reaktiven Bereichen der Allergene, die ihrerseits die Basis für die Konstruktion der erfindungsgemäßen modifizierten rekombinanten Allergene darstellen.

20

25 Um die Reaktivität von modifizierten rekombinanten Allergenen mit den T-Lymphozyten, die bei Allergikern auftreten, zu gewährleisten, werden die T-Zell-reaktiven Bereiche, die die immundominanten T-Zell-Epitope einschließen, von Veränderungen hinsichtlich der Primärstruktur teilweise 30 oder vollständig ausgeschlossen.

35

In den verbleibenden Bereichen der Polypeptide (Allergene) werden in den zugrundliegenden DNA-Sequenzen gentechnisch Mutationen vorgenommen, um eine veränderte Primärstruktur zu erzeugen. Durch diese veränderte Primärstruktur wird die Bindungsfähigkeit von 5 sequenzabhängigen kontinuierlichen B-Zell-Epitopen zu den IgE-Antikörpern zerstört oder eingeschränkt und die Reaktivität von konformationsabhängigen, eventuell diskontinuierlichen Epitopen mit ihren Antikörpern durch die Ausbildung einer abgewandelten Tertiärstruktur als Folge der Primärmodifikation vollständig oder teilweise aufgehoben.

10 Die Mutationen können Substitutionen einzelner oder mehrerer Aminosäuren außerhalb der T-Zell-reaktiven Bereich darstellen. Solche Punktmutationen werden durch ortsspezifische Mutagenese mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) in die DNA, die z. B. für das rPhI p 5b 15 kodiert, eingeführt. Als Matrize können dabei das Plasmid pGS13, ein Expressionsvektor (pMalc), der die cDNA für rPhI p 5b enthält, dienen. Zur PCR werden genspezifische Primer verwendet, die entsprechende Basenaustausche und gleichzeitig eine neue Restriktionsschnittstelle (Nhe I bzw. Sph I) enthalten. Die in der PCR amplifizierten Fragmente, die die 20 Mutation tragen, wurden nacheinander in einen Klonierungsvektor ligiert, und dann das komplette Produkt in den pMalc-Expressionsvektor umkloniert.

25 Weiterhin können Mutationen durch unterschiedlich angeordnete Deletionen vorgenommen werden. Zur Herstellung der Deletionsmutanten werden in einer PCR mit Hilfe von genspezifischen Primern verkürzte 3'-terminale Fragmente der cDNA von rPHI p 5b hergestellt. Aus den Ausgangsvektoren (pGS12 oder pGS13) werden durch Restriktion an 30 internen Schnittstellen größere 3'-terminale Fragmente entfernt, und an deren Stelle die jeweils kleineren in der PCR amplifizierten Fragmente einligiert.

35 In analoger Art und Weise lassen sich Mutationen durch Additionen von ein oder mehreren Aminosäuren durch Einschub von zusätzlich DNA-Fragmenten erzeugen.

Die gentechnisch mutierten DNA-Klone, die für modifizierte rekombinante Allergene kodieren, werden in geeignete Expressionsvektoren umkloniert und in geeigneten Wirtsorganismen zur Expression gebracht. Aus den Überständen oder Aufschlüssen dieser Wirtsorganismen werden in 5 üblicher Weise die Fusionsproteine gereinigt und nach Abspaltung des Fusionsanteils die modifizierten rekombinanten Allergene mit üblichen biochemischen Methoden rein dargestellt. Es ist wichtig, dass die modifizierten rekombinanten Allergene als reine Komponenten, die den natürlichen Allergenen entsprechen, für weitere Testmengen benutzt 10 werden.

Die Auswirkungen der induzierten Mutationen auf die Allergenität, d.h. der Bindungsfähigkeit an IgE-Antikörper von Allergikern, der modifizierte rekombinante Allergene wird durch den EAST-Hemmttest qualitativ und 15 quantitativ bestimmt. Dieser Assay zeigt, ob eine zu testende Substanz (modifiziertes rekombinantes Allergen) mit dem natürlichen Allergen und/oder dem rekombinanten Wildtyp identisch oder verschieden ist. Darüber hinaus lässt sich der Grad der immunchemischen Verwandschaft (Kreuzreaktivität) quantifizieren. Dieser EAST-Hemmttest berücksichtigt nur 20 die Reaktion mit IgE-Antikörpern.

Als geeignete modifizierte rekombinante Allergene-Varianten werden diejenigen ausgewählt, die eine im Vergleich zum natürlichen Allergen und/oder rekombinanten Wildtyp mindestens um den Faktor  $10^2$  25 verringerte Hemmwirkung, gemessen als  $P_{rel}$  bei 50% Hemmung, aufweisen.

Die so ausgewählten modifizierte rekombinante Allergene-Varianten werden überprüft, ob die T-Zell-Reaktivität tatsächlich erhalten ist. Dazu 30 wird in der ersten Phase ein Satz von T-Zellklonen, die mit Epitopen in den T-Zell-reaktiven Bereichen reagieren, zur Testung herangezogen.

Nur solche modifizierte rekombinante Allergene werden berücksichtigt, die die ausgewählten Klone zur Proliferation stimulieren.

In der zweiten Phase werden oligoklonale T-Zell-Linien, die durch mehrfache Stimulierung mit den betreffenden Allergen etabliert worden sind, zur Testung eingesetzt. Wiederum werden nur solche modifizierten rekombinanten Allergene berücksichtigt, die mindestens einen Stimulationsindex (SI) von 50 % des SI des Wildtyps bedingen.

5

In der dritten Phase werden polyklonale Kurzzeit-T-Zell-Kulturen aus dem peripheren Blut von Allergikern zur Testung eingesetzt.

10

Für die allergische Reaktion (Nebenwirkung) ist außer der Bindung des Allergens an das spez. IgE die allergeninduzierte, IgE-vermittelte Histaminfreisetzung durch allergische Effektorzellen von pathophysiologischer Bedeutung. Dabei ist auch die Reagibilität der Effektorzellen (Basophile, Mastzellen) und die Epitopspezifität der über Fc $\epsilon$ RI gebundenen IgE-Antikörper von Belang. Deshalb werden die modifizierte rekombinante Allergene-Varianten auf ihre Potenz zur Induktion der Histaminfreisetzung durch Degranulation IgE-beladener Basophiler, die aus dem Blut von Allergikern präpariert werden, getestet. Die modifizierte rekombinante Allergene-Varianten, die nach obigen Selektionsregime ausgewählt worden sind, müssen in diesem funktionellen Test eine starke reduzierte Fähigkeit zur Histaminfreisetzung aufweisen.

15

20

25

Die modifizierte rekombinante Allergene, die diese Anforderungen erfüllen, gewährleisten eine Reaktivität mit der Mehrheit der regulatorisch wirksamen TH-Zellen und besitzen aufgrund ihrer verminderten IgE-Reaktivität die erforderlichen Eigenschaften, um als Therapeutika zur allergenspezifischen Immuntherapie (Hyposensibilisierung) von Graminaenpollenallergikern eingesetzt zu werden.

30

Gegenstand der Erfindung sind ferner pharmazeutische Zubereitungen enthaltend ein oder mehrere modifizierte rekombinante Allergene gemäß der vorliegenden Erfindung und/oder eines ihrer physiologischen unbedenklichen Salze oder Solvate sowie gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur Behandlung von IgE-vermittelten Allergien.

35

Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen, wobei mindestens ein modifiziertes rekombinantes Allergen und/oder eines seiner physiologischen unbedenklichen Salze oder Solvate zusammen mit mindestens einem festen, flüssigen oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff in eine geeignete Dosierungsform bringt.

— Gegenstand der Erfindung ist ferner die Verwendung der modifizierten rekombinanten Allergene und/oder ihrer physiologisch unbedenklichen Salze oder Solvate zur Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen, insbesondere auf nicht-chemischem Wege. Hierbei können sie zusammen mit mindestens einem festen, flüssigen und/oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff und gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren weiteren Wirkstoffen in eine geeignete Dosierungsform gebracht werden. Die Arzneimittel dienen zur immunspezifischen Therapie, d. h. zur Hyposensibilisierung bei Allergien. Die direkte Verwendung der modifizierten rekombinanten Allergene zur immunspezifischen Therapie (Hyposensibilisierung) von Allergien ist ebenfalls denkbar.

Diese Zubereitungen können als Arzneimittel in der Human- oder Veterinärmedizin verwendet werden. Als Trägerstoffe kommen organische oder anorganische Substanzen in Frage, die sich für die enterale (z.B. orale), parenterale, topische Applikation oder für eine Applikation in Form eines Inhalation-Sprays eignen und mit den neuen Verbindungen nicht reagieren, beispielsweise Wasser, pflanzliche Öle, Benzylalkohole, Alkylenglykole, Polyethylenglykole, Glycerintriacetat, Gelatine, Kohlehydrate wie Lactose oder Stärke, Magnesiumstearat, Talk, Vaseline. Zur oralen Anwendung dienen insbesondere Tabletten, Pillen, Dragees, Kapseln, Pulver, Granulate, Sirupe, Säfte oder Tropfen, zur rektalen Anwendung Suppositorien, zur parenteralen Anwendung Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate, für die topische Anwendung Salben, Cremes oder Puder. Die neuen Verbindungen können auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z.B. zur Herstellung von Injektionspräparaten verwendet werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert

sein und/oder Hilfsstoffe wie Gleit-, Konservierungs-, Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffersubstanzen, Farb-, Geschmacks- und /oder mehrere weitere Wirkstoffe enthalten, z. B. ein oder mehrere Vitamine.

5 Für die Applikation als Inhalationsspray können Sprays verwendet werden, die den Wirkstoff entweder gelöst oder suspendiert in einem Treibgas oder Treibgasgemisch (z. B. CO<sub>2</sub> oder Fluorchlorkohlenwasserstoffen) enthalten. Zweckmäßig verwendet man den Wirkstoff dabei in mikronisierter Form, wobei ein oder mehrere zusätzliche physiologisch 10 verträgliche Lösungsmittel zugegen sein können, z. B. Ethanol. Inhalationslösungen können mit Hilfe üblicher Inhalatoren verabreicht werden.

Die Verbindungen und ihre physiologisch unbedenklichen Salze können 15 zur Hypo sensibilisierung von Allergikern bei der Bekämpfung von allergischen Erkrankungen, insbesondere von Allergien, die durch Gräser und Gras pollen hervorgerufen werden, verwendet werden.

Dabei können die erfindungsgemäßen Substanzen in der Regel in Analogie zu anderen bekannten, im Handel befindlichen Peptiden, insbesondere aber in Analogie zu den in der US-A-4 472 305 beschriebenen 20 Verbindungen verabreicht werden, vorzugsweise in Dosierungen zwischen etwa 0,05 und 500 mg, insbesondere zwischen 0,5 und 100 mg pro Dosierungseinheit verabreicht. Die tägliche Dosierung liegt vorzugsweise zwischen etwa 0,01 und 2 mg/kg Körpergewicht. Die spezielle Dosis für jeden Patienten hängt jedoch von den verschiedensten Faktoren ab, beispielsweise von der Wirksamkeit der eingesetzten speziellen 25 Verbindung, vom Alter, Körpergewicht, allgemeinen Gesundheitszustand, Geschlecht, von der Kost, vom Verabreichungszeitpunkt und -weg, von der Ausscheidungsgeschwindigkeit, Arzneistoffkombination und Schwere 30 der jeweiligen Erkrankung, welcher die Therapie gilt. Die parenterale Applikation ist bevorzugt.

35 Vor- und nachstehend sind alle Temperaturen in °C angegeben. Zur Isolierung der Produkte gibt man, falls erforderlich, Wasser hinzu, stellt,

falls erforderlich, je nach Konstitution des Endprodukts auf pH-Werte zwischen 2 und 10 ein, extrahiert mit Ethylacetat oder Dichlormethan, trennt ab, trocknet die organische Phase über Natriumsulfat, dampft ein und reinigt durch Chromatographie an Kieselgel und /oder durch  
5 Kristallisation.

Beispiel 1

10 **Identifizierung der T-Zell-Epitope zur Bestimmung der T-Zell-reaktiven Bereiche des Graspollenhauptallergens Phl p5**

15 Für die Etablierung von T-Zell-Linien (TCL) und -Klonen (TCC), die mit dem Graspollenhauptallergen der Gruppe 5 des Lieschgrases (Phleum pratense) Phl p5 reagieren, wurden Patienten ausgewählt, die anamnestisch eine typische Symptomatik für eine Gräserpollenallergie (Rhinitis) angaben und einen positiven Hauttest (Pricktest) aufwiesen. Diese Patienten hatten zirkulierende spezifische IgE-Antikörper mit einer RAST-Klasse  $\geq 3$ .

20 Es wurden je Patient 40 ml heparinisiertes Blut gewonnen. Danach wurden aus dieser Blutprobe nach üblichem Verfahren mittels Dichtegradientenzentrifugation periphere mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert. Analoge Zellisolierungen erfolgten später, wenn die Gewinnung bestrahlter autologer Antigen-präsentierender Zellen (APZ) zur weiteren  
25 Charakterisierung der TCL und TCC notwendig war. Nach Zählung der PBMC wurden TCL mit Reaktivität auf Gruppe 5-Allergene in vitro wie folgt und bereits an anderen Stellen detailliert beschrieben (Lit. 1) etabliert: In 24 well - Mikrokulturplatten wurden pro Kavität 1,5 bis  $2,0 \times 10^6$  PBMC in 1 ml Kulturmedium (UltraCulture) 7 Tage lang unter Zugabe von  
30 immunaffinitätschromatographisch gereinigten natürlichen Phl p5-Allergenen (je 10  $\mu$ g/well) stimuliert. Es wurden insgesamt 8 bis 10 dieser Kulturen angelegt. Die immunoaffinitätschromatographische Isolierung von Phl p 5 ist detailliert beschrieben (Lit. 2). Nach Ablauf der 7 Tage-Kultivierung wurde den Zellkulturen IL-2 (10 bis 20 IU/well) für weitere 5  
35 bis 7 Tage zugegeben. Anschließend wurden alle Einzelkulturen gepoolt, über Dichtegradientenzentrifugation die T-Zellblasten angereichert und die

gewonnene TCL im spezifischen Lymphozytenproliferationstest geprüft (siehe auch Lit. 1). Hierzu wurden in 96 well - Mikrokulturplatten im Dreifachansatz jeweils  $2 \times 10^4$ /ml TCL-Blasten mit  $5 \times 10^4$ /ml bestrahlten autologen APZ's kultiviert. Als spezifischer Antigenstimulus wurden 10 - 20 µg Phl p5-Allergen hinzugegeben. Nach 56 Stunden Inkubation wurde zu den Mikrokulturen  $^3$ H-markiertes Thymidin (1µCi/well) pipettiert. Weitere 16 Stunden später wurde die in den proliferierenden T-Zellblasten inkorporierte Radioaktivität in einem Beta-Counter (Matrix 96) gemessen. Die Resultate wurden als arithmetisches Mittel der Mehrfachansätze in Counts pro Minute (cpm) errechnet. Das Kriterium für die Qualität der TCL war der Stimulationsindex, der sich aus der Relation der cpm-Werte mit Phl p5-Zusatz zu denen ohne Phl p5-Zusatz ergab.

Nach Auswahl der TCL's wurden diese kloniert (s. Lit. 1). Dazu wurden 0,3  
15 TCL-Blasten / well in einem Endvolumen von 0,2 ml in 96 well-  
Mikrokulturplatten (Rundboden) unter Zugabe bestrahlter allogener PBMC  
( $5 \times 10^4$ /well), PHA (1,5 g/ml) und IL-2 (25 IU/ml) kultiviert. Nach 12 bis 14  
Tagen wurden die Kulturen mit frischen bestrahlten PBMC, PHA und IL-2  
20 gefüttert. Außerdem wurde alle 4 bis 5 Tage ein Mediumaustausch unter  
Zugabe von IL-2 (25 IU/ml) durchgeführt. Vor Durchführung des Phl p5 -  
spezifischen Proliferationstestes verstrich eine ca. 10 Tage lange Periode  
ohne Zugabe bestrahlter allogener PBMC. Die ausgewählten TCC wurden  
dann in 24 well - Mikrokulturplatten durch wiederholte Stimulation mit PHA,  
bestrahlten allogenen PBMC und IL-2 (50 IU/ml) vermehrt.

25 Nach Klonierung einer TCL (siehe unten) wurde die Spezifität der isolierten  
TCC wie eben beschrieben bestimmt. Für die TCC wurden  
Stimulationsindices von mindestens 5 als positiv gewertet. Auch die  
Bestimmung von T-Zellepitopen zur Festlegung der T-Zell-reaktiven  
30 Bereiche auf Gruppe 5 - Allergenen erfolgte mittels spezifischer  
Proliferationsteste, wobei hierfür jeweils 1-2 µg/ml synthetisierter Dodeca-  
peptide eingesetzt wurden (siehe unten).

35 Für die Bestimmung der T-Zellepitope wurden insgesamt 86 überlappende  
synthetische Dodecapeptide verwendet, die auf der Grundlage der  
bekannten Primärstruktur des Phl p 5b-Allergens gemäß Bufe et al. (Lit. 3)

hergestellt wurden. Die Herstellung dieser Peptide erfolgte mit einem kommerziellen Synthese-Kit der Firma CHIRON Mimotopes Peptide Systems / Clayton, Australien. Diese Peptide besaßen bezüglich ihrer Aminosäuresequenzen einen Überlappungsgrad von 9 Aminosäuren (Tab. 5 1). Die Reaktion von TCC auf eines der im spezifischen Proliferationstest verwendeten Peptide wurde als positiv bewertet, wenn der errechnete Stimulationsindex mindestens 5 betrug.

10 In die Untersuchungen wurden TCC von 18 Graspollenallergikern einbezogen. Von diesen konnten 54 T-Zellklone isoliert werden, die mit den Dodecapeptiden, basierend auf der Phl p 5b-Sequenz, spezifisch reagieren. Die Analyse dieser TCC zeigt eine deutliche Konzentration der Erkennung von Peptidliganden in 3 immundominanten T-Zell-reaktiven Bereichen. Von den 54 T-Zellklone reagieren 46, dies entspricht 85%, mit den Peptiden der 3 immundominanten T-Zell-reaktiven Bereichen A, B und C des Phl p 5b (Tab. 1a). Nur 8 T-Zellklone reagierten mit 5 anderen Peptidliganden, wobei 3 Peptide von jeweils 2 differenten Klonen erkannt werden. Der immundominante T-Zell-reaktive Bereich **A** umfaßt ein Peptid (27mer) entsprechend den Positionen 181-207, mit einer Kernregion bestehend aus den Aminosäuren 181-195. 28 der 54 Phl p 5b-reaktiven TCC, dies entspricht 51%, reagieren allein mit diesem immundominanten Bereich **A**.

25 Mit den T-Zell-reaktiven Bereichen **C** (Position 16-48; 33mer) und **B** (Position 133-150) reagieren 9 (17%) bzw. 9 (17%) der T-Zell-Klone. Diese Konzentration der TH-Zellen des untersuchten Allergikerkollektivs auf die Erkennung von 3 immundominanten T-Zell-reaktiven Bereichen des Hauptallergens Phl p 5b läßt die Konstruktion von Phl p 5b-Mutanten zu, bei denen diese Bereiche von den Punkt-, Deletions- oder Additions-30 Mutationen nicht berührt werden. Damit ist die Voraussetzung gegeben, daß solche Allergen-Mutanten mit der bei Allergikern vorhandenen Allergen-reaktiven TH-Zellen spezifisch reagieren und diese im therapeutischen Sinne beeinflussen.

Tab. 1: Auf der PhI p 5b-Sequenz basierende Dodecapeptide zur Bestimmung der T-Zell-reaktiven Bereiche

5	1	ADAGYAPATPAA	44	KIPAGELQIIDK
	2	GYAPATPAAAGA	45	AGELQIIDKIDA
	3	PATPAAAGAAAG	46	LOIIDKIDAQFK
	4	PAAAGAAAGKAT	47	IDKIDAQFKVAA
	5	AGAAAGKATTEE	48	IDAQFKVAATAA
	6	AAGKATTEEQKL	49	AFKVAATAAATA
	7	KATTEEOKLIED	50	VAATAAATAPAD
	8	TEEQKLIEDINV	51	TAAATAPADDKF
10	9	QKLIEDINVGFK	52	ATAPADDKFTVF
	10	IEDINVGFKAAV	53	PADDKFTVFEAA
	11	INVGFKAAVAAA	54	DKFTVFEAAFNK
	12	GFKAAVAAAASV	55	TVFEAAFNKAIK
	13	AAVAAAASVPA	56	EAAFNKAIKEST
	14	AAAASVPAADKF	57	FNKAIKESTGGA
	15	ASVPAADKFKTF	58	AIKESTGGAYDT
15	16	PAADKFKTFEAA	59	ESTGGAYDTYKC
	17	DKFKTFEEAFTS	60	GGAYDTYKCIPS
	18	KTFEEAFTSSSK	61	YDTYKCIPSLEA
	19	EAAFTSSSKAAA	62	YKCIPSLEAAVK
	20	FTSSSKAAAAKA	63	IPSLEAAVKQAY
	21	SSKAAAQAPGL	64	LEAAVKOAYAAT
20	22	AAAQAPGLVPK	65	AVKQYAATYAA
	23	AKAPGLVPKLD	66	QAYAATVAAAPQ
	24	PGLVPKLDAAYS	67	AATVAAAPQVKY
	25	VPKLDAAYSVAY	68	VAAAPQVKYAVF
	26	LDAAYSVAYKAA	69	APQVKYAVFEAA
	27	AYSVAYKAAVGA	70	VKYAVFEAALT
	28	VAYKAAVGATPE	71	AVFEAALT
25	29	KAAGVATPEAKF	72	KAITAMS
	30	VGATPEAKFDSF	73	LTKAITAMSEVQ
	31	TPEAKFDSFVAS	74	AITAMSEVQKVS
	32	AKFDSFVASLTE	75	AMSEVQKVSQPA
	33	DSFVASLTEALR	76	EVOKVSOPATGA
	34	VASLTEALRVIA	77	KVSQPATGAATV
	35	LTEALRVIAAGAL	78	QPATGAATVAAG
30	36	ALRVIAGALEVH	79	TGAATVAAGAAT
	37	VIAGALEVHAVK	80	ATVAAGAATTAA
	38	GALEVHAVKPVT	81	AAGAATTAAGAA
	39	EVHAVKPVTTEEP	82	AATTAAGAASGA
	40	AVKPVTTEEPGMA	83	TAAGAASGAATV
	41	PVTEEPGMAKIP	84	GAASGAATVAAG
35	42	EEPQMAKIPAGE	85	SGAATVAAGGYK
	43	GMAKIPAGELOI	86	GAATVAAGGYKV

Tab. 1a: Kartierung der T-Zell-reaktiven Bereiche des Graspollen-hauptallergens Phl p 5

	TCC	Stimulierende Peptidliganden (12mer)	Immundominanter T-Zell-reaktiver Bereich			Minor Epitop
			A	B	C	
5	DW 8	139-150		+		
	DW 14	196-207	+			
	DW 16	181-192, 184-195	+			
	DW 23	181-192	+			
10	DW 25	181-192, 184-195	+			
	DW 28	184-195	+			
	CBH 1	211-222, 214-225				+
	CBH 10	211-222				+
	JR 6a	22-33, 25-36				
	JR 6b	136-147, 139-150		+		
15	JR 7a	28-39, 31-42			+	
	JR 7b	136-147, 139-150		+		
	JR 9	181-192, 184-195	+			
	JR 10	19-30			+	
	JR 11	49-60				+
	JR 13	181-192, 184-195	+			
	JR 15	181-192, 184-195	+			
20	JR 19a	31-42			+	
	JR 19b	136-147		+		
	JR 24	97-108, 100-111				+
	JR 25	181-192, 184-195	+			
	JR 27	184-195	+			
	KS 1	181-192, 194-195	+			
25	KS 2	181-192, 194-195	+			
	KS 3	181-192, 194-195	+			
	KS 4	181-192, 194-195	+			
	KS 5	181-192, 194-195	+			
	KSE 18	43-54				+
	UD 6	112-123				+
30	GE 4	136-147, 139-150		+		
	GE 7	136-147		+		
	GE 12	37-48			+	
	AS 4	181-192, 184-195	+			
	AS 5	181-192, 184-195	+			
35	UZH 2	136-147, 139-15		+		
	UZ 25	97-108				+

- 28 -

5	CB 1	190-201, 193-204	+		
	CB 2	181-192, 184-195	+		
	CB 7	25-36		+	
	CB 10	181-192, 184-195	+		
	CB 14	181-192	+		
	MF 11	184-195	+		
	AH 19	16-27		+	
	AH 26	139-150	+		
	JMD 3	133-144	+		
10	45		A22	9B	7c
	II 3.2A 12	31-42			+
	II 12.7F11	196-207	+		
	II 12.5C10	187-198	+		
	II 17.9E5	184-195	+		
	II 17.1D8	184-195	+		
	II 17.11C2	184-195	+		
	II 17.19A1	193-204	+		
	II 17.12F5	25-36		+	
15	II 17.3C10	49-60, 52-63			+
	54		28	9	9
					8

20

25

30

35

## Literatur:

1. Müller WD, Karamfilov T, Fahlbusch B, Vogelsang H, Jäger L:  
„Analysis of human T cell clones reactive with group V grass pollen allergens“. Int. Arch. Allergy Immunol. 1994, 105:391-396.
- 5 2. Jung K, Fahlbusch B, Müller WD, Hermann D, Diener C, Jäger L:  
„Isolation of timothy (Phleum pratense) allergens using affinity chromatography with monoclonal antibodies“. Allergy Immunol (Leipzig) 1989, 35:287-294
- 10 3. Bufl A, Schramm G, Keown MB, Schlaak M, Becker WM:  
„Major allergen Phl p 5b in timothy grass is a novel pollen Rnase“. FEBS Letters 1995, 263:6-12.

15 Beispiel 2**Herstellung der Punktmutanten PM1, PM2 (D<sup>48</sup> → L, K<sup>50</sup> → A) und PM3 (A<sup>13</sup> → C) des rPhl p 5b**

20

PM2:

Als Ausgangsvektor diente das Plasmid pGS13. Es handelt sich hierbei um einen pMalc-Vektor (Biolabs), der die cDNA für das wt rPhl p 5b Bam HI / Hind III kloniert enthält. In einer PCR-Reaktion wurden die Fragmente 1 (Bp: 1 - 153) und 2 (Bp: 141 - 1374) der cDNA des rPhl p 5b amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer verwendet (Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen):

Fragment 1:

30

Phl p 5b sense:

5'-ATATGGATCCCATCGAGGGAAGGGCCGATGCCGGCTACGCC-3'

MP1 antisense:

5'-GAACGCTAGCGCCGCAGGGACGCTGGC-3'

35

Fragment 2:

MP1 sense:

5'-GCGCTAGCGTTCAAGACCTTCGAG-3'

5

PhI p 5b antisense:

5'-ATATAAGCTTTCCTCTGAAGGAAGGCAACCC-3'

10 Die beiden Mutagenese-Primer MP1 sense und MP1 antisense enthalten 6 Basenaustausche gegenüber der wt-Sequenz, die zusätzlich eine neue Restriktionsschnittstelle für das Enzym Nhe I, ergeben.

15 Das amplifizierte Fragment 1 wurde Bam HI /Nhe I verdaut und in den Vektor pUH89 (Jekel et al., Gene: 154, 55-59; 1995) kloniert. Das resultierende Plasmid pGS10 wurde erneut mit Nhe I / Hind III restriktiert und in diese Schnittstellen das Fragment 2 (Nhe I / Hind III) eingebaut. Dieses Plasmid pGS11 enthält die komplette cDNA, die für das rPhI p 5b kodiert, mit den gewünschten Basenaustauschen. Zur Expression der 20 Punktmutante rPhI p 5b PM2 wurde die mutierte cDNA in die Bam HI / Hind III-Schnittstellen in den Expressionsvektor pMalc umkloniert. Das entstandene Plasmid wurde mit pGS21 bezeichnet.

25 Die Punktmutante rPhI p 5b PM1 wurde analog zu PM2 hergestellt. Sie enthält, bedingt durch einen PCR-Fehler, eine zusätzliche Punktmutation: N<sup>32</sup> → D.

Zur Klonierung dieser Punktmutante wurde die gesamte cDNA von rPhI p 5b im Vektor p GS13 in einer PCR mit folgenden Primern appliziert.

30 PCysM1:

5'ATATGGATCCCATCGAGGGTAGGGCCGATGCCGGCTACGCCCGG  
CACCCCGGCTGCATGCAGGAGCG-3'

PhI p 5b antisense: siehe oben.

35

Der Mutagenese-Primer PCysM1 enthält 3 Basenaustausche gegenüber der wt-Sequenz, die zum Austausch eines Alanin-Restes gegen einen Cystein-Rest führen, und gleichzeitig eine neue Restriktionsschnittstelle für das Enzym Sph I ergeben. Das PCR-Produkt wurde direkt in den Expressionsvektor pMalc (Bam HI / Hind III) kloniert. Der resultierende Vektor wurde mit pCysM1 bezeichnet. Die erfolgreiche Mutagenese wurde in einer Restriktionsanalyse mit Sph I überprüft.

10 Beispiel 3

**Herstellung der Deletionsmutanten DM1 ( $\Delta K^{50}$  -  $P^{132}$ ,  $D^{49} \rightarrow L$ ), DM2 ( $\Delta F^{51}$  -  $G^{178}$ ,  $D^{49} \rightarrow L$ ,  $K^{50} \rightarrow A$ ) und DM3 ( $\Delta A^{154}$  -  $T^{177}$ ,  $A^{220} \rightarrow T$ )**

15 Als Ausgangsvektor für die Klonierung der Deletionsmutante DM1 diente das Plasmid pGS21 (siehe oben). In einer PCR wurde das Fragment Bp 399 - 1374 der cDNA von rPhl p 5b amplifiziert unter Verwendung der folgenden Primer:

20

MP2 sense:

5'-GCTAGCCGGCGAGCTGCAGATCATCG-3'

25

Phl p 5b antisense: siehe oben.

30

Der Vektor pGS21 wurde Nhe I / Bam HI restriktiert, vom herausgeschnittenen Fragment getrennt und in den Restvektor das ebenfalls Nhe I / Bam HI restriktierte PCR-Produkt eingesetzt. Der daraus resultierende Vektor pDM1 enthält die cDNA des rPhl p 5b mit einer Deletion von 252 bp, die für die Deletionsmutante rPhl p 5bDM1 kodiert. Die Deletionsmutanten DM2 und DM3 wurden analog hergestellt.

35

Beispiel 4**Nachweis der verminderten Allergenität (IgE-Reaktivität) der rekombinanten Phl p 5b-Mutanten durch den EAST-Hemmtest**

5

Die Bindung der Allergene durch die IgE-Antikörper ist die Grundvoraussetzung für die Allergen-spezifische Aktivierung der Effektorzellen (Mastzellen, Basophile u.a.) bei der Typ I-Allergie. Die 10 Bindung der Allergene an IgE-Antikörper kann am besten mit der Allergen-spezifischen Hemmung des Enzym-Allergen-Sorbent-Tests (EAST) qualitativ und quantitativ erfaßt werden. Der EAST-Hemmtest wird wie folgt ausgeführt. Mikrotiterplatten werden mit Allergen (natürliches oder rekombinantes Phl p 5 bzw. Phl p 5b) beschichtet (1 µg/ml). Nach 15 Entfernung der nicht gebundenen Allergenmoleküle durch Waschung werden unspezifische Plastbindungsstellen mit Rinderserumalbumin (0,5%) blockiert. Anti-IgE von Allergikern, als repräsentativer Pool von 10-30 Spendern oder als Einzelserum, wird in einer geeigneten Verdünnung mit den Allergen-beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Die gebundenen 20 allergenspezifischen IgE-Antikörper werden mittels Enzym-gekoppeltem Anti-IgE (z.B. Alk. Phosphatase - a-IgE) quantifiziert. Diese Bindung wird durch lösliches Allergen oder die zu prüfende Substanz (Allergen-Mutanten) in Abhängigkeit von der Konzentration gehemmt. Als Bezug dient die Hemmkurve mit dem gereinigten natürlichen Allergen Phl p 5b.

25

Mit dem repräsentativen Allergikerserum-Pool Bor 18/100 (20 Spender) ergeben sich die in Abb. 1 dargestellten Hemmkurven.

30

Das rPhl p 5b (Wildtyp) und die PM3 zeigen dem affinitätschromatographisch gereinigten, natürlichen Phl p 5b ähnliche Bindungskurven. Geringfügige Unterschiede werden durch bessere Hemmwirkung im niedrigeren Bereich sowie durch schlechtere Hemmung in hohen Konzentrationen sichtbar. Die Ursache hierfür ist unbekannt, könnte aber in geringfügig differierenden Konformationsepitopen 35 begründet sein.

Die Punktmutante PM1 zeigt diesen Effekt im höheren Bereich etwas stärker ausgeprägt. Deutlich verminderte Hemmwirkung weisen die Deletionsmutanten DM1 und DM3 auf. Dies belegt die stark reduzierte Allergenität dieser Allergen-Mutanten, die damit mit chemisch modifizierten Allergen (Allergoiden) vergleichbar sind.

Die Deletionsmutanten DM2 und DM2\* zeigen eine extrem geringe Hemmwirkung der Allergen-IgE-Reaktion. Dies zeigt, daß die Allergenität dieser Mutanten weitgehend eliminiert ist. Ein anderer Allergiker-Serumpool (We 6/97) sowie die Einzelseren der Allergiker II3, II12 und II17 zeigen zwar leichte Variationen der Hemmkurven mit den Mutanten, bestätigen aber, daß die Deletionsmutanten DM1 und DM3 eine stark reduzierte Allergenität aufweisen (Abb. 2-5). Die Hemmwirkung der Deletionsmutanten DM2 und DM2\* ist auf eine geringe Restaktivität 15 eliminiert. Die Punktmutationen PM1 und PM3 zeigen keine oder nur eine meist geringe Reduktion der Allergenität (z.B. PM1 mit Pool We 6/97 und Einzelserum II 17). Die Hemmkapazität der modifizierten Allergene kann durch Berechnung der Prel-Werte bei 25%iger oder 50%iger Hemmung quantifiziert werden (1). Die entsprechenden Hemmwerte und sowie die 20 Allergene Potenz (Prel) gemessen bei 25 bzw. 50% Hemmung sind in den Tabellen 2-6 für die Serumpools und Einzelseren dargestellt.

Die Deletionsmutation DM2 und DM2\* zeigen den Verlust der Allergenität durch die extrem kleinen oder nicht mehr sinnvoll bestimmmbaren Prel-Werte. Die Punktmutationen PM1 und PM3 zeigen teilweise einen Allergenitätsverlust, der aber für praktische Anwendung nicht ausreicht. Die Deletionsmutanten DM 1 und DM 3 weisen eine starke Reduzierung der Allergenität auf. Die Reduzierung der IgE-Reaktivität ist besser oder vergleichbar mit den bisher bekannten chemisch modifizierten Allergenen 30 und macht dadurch diese Mutanten zu besonders geeigneten Kandidaten für die Immuntherapie.

#### Literatur

35 Anderson MC and Baer H: Methology for RAST inhibition. Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland, U.S.A. (1986).

- 34 -

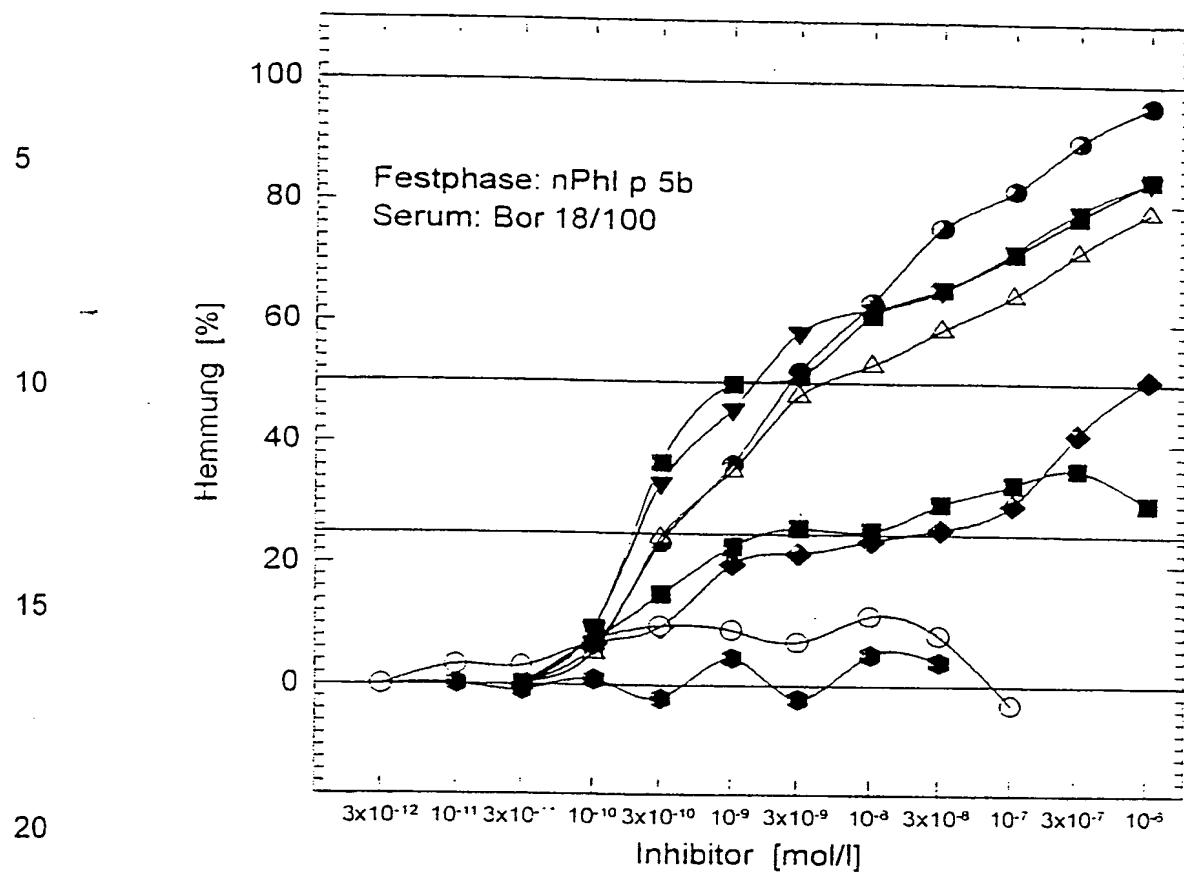


Abbildung 1 EAST - Hemmkurven der Phl p 5b - Mutanten mit dem Allergiker - Serum pool Bor 18/100

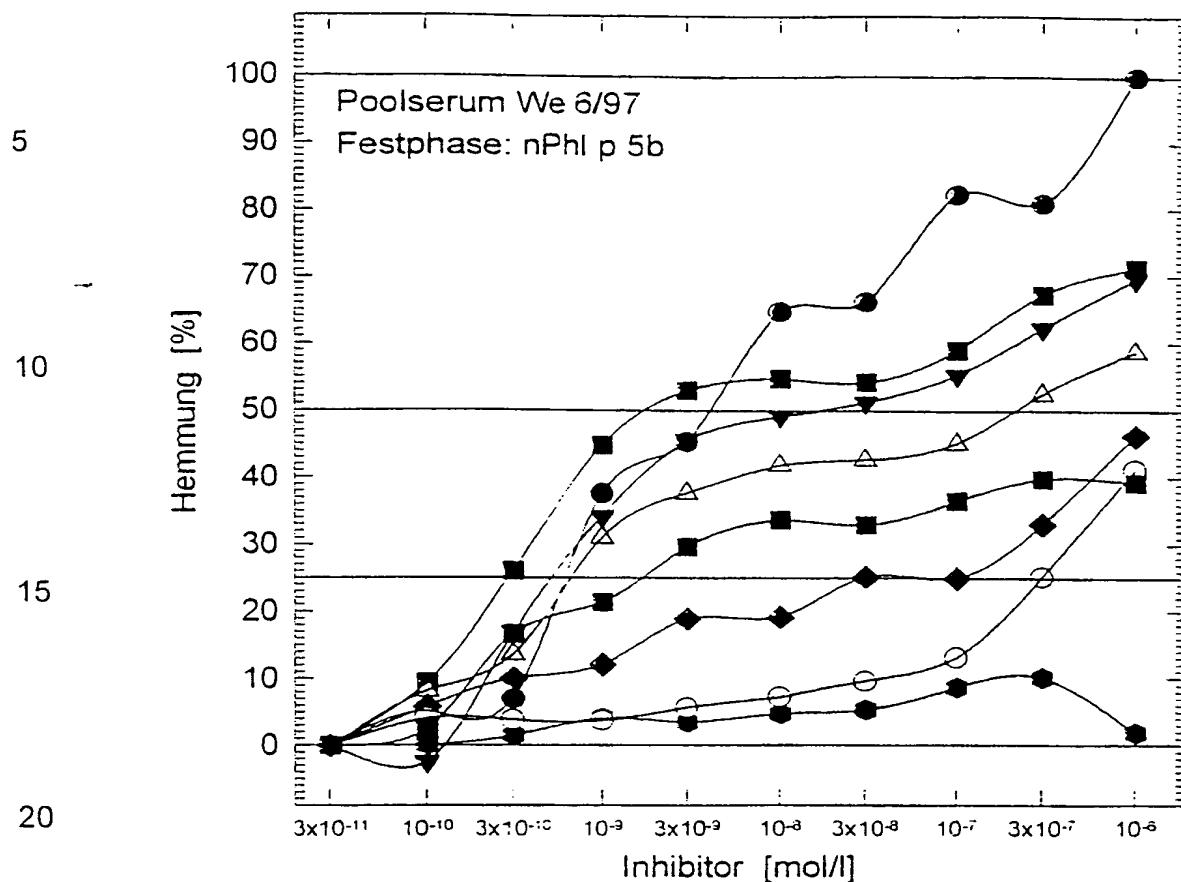
Inhibitoren:

● nPhl p 5b	△ PM 1	↔ DM 1	● DM 2
■ rPhl p 5b	▼ PM 3	■ DM 3	○ DM 2*

30

35

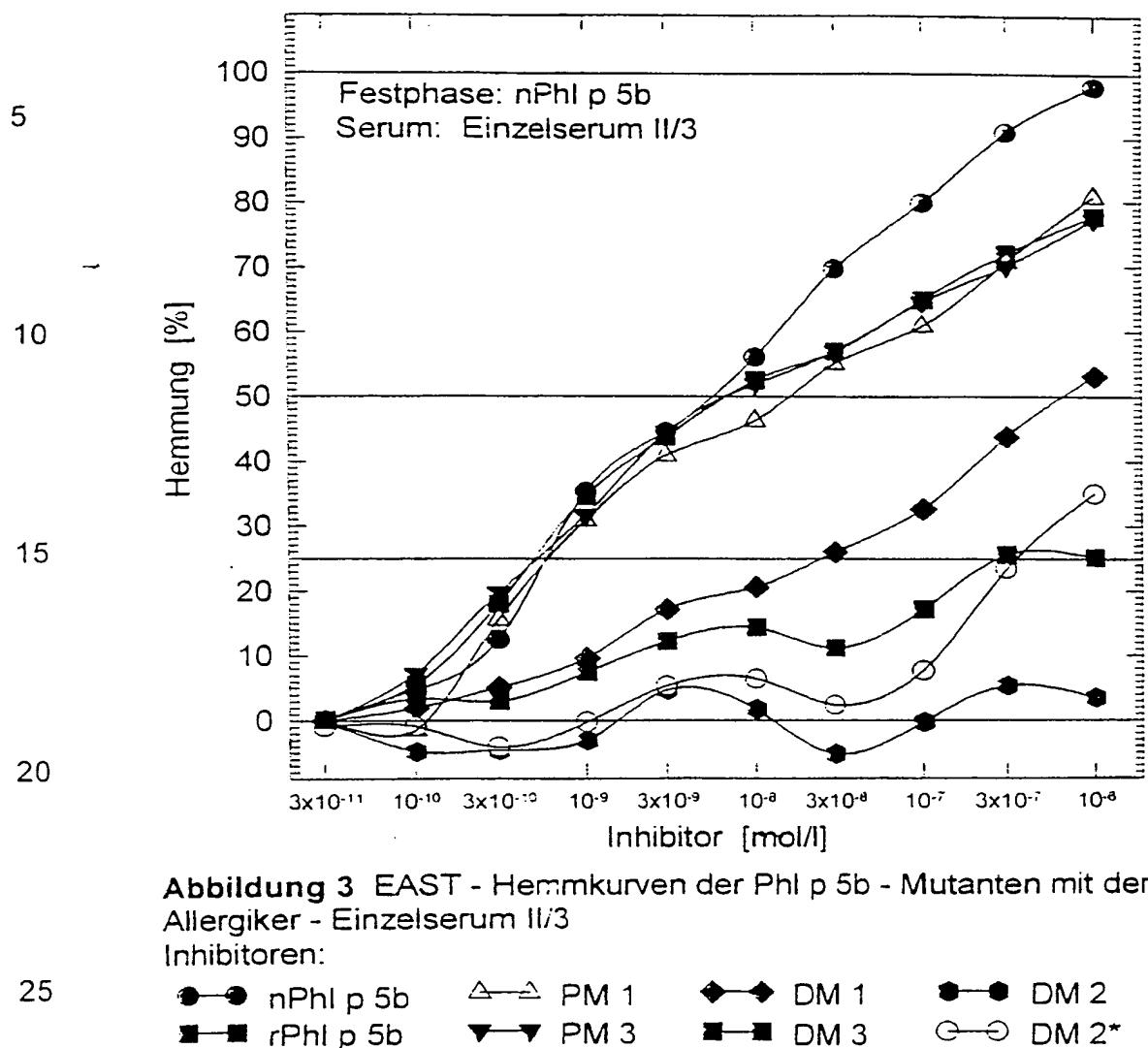
- 35 -



**Abbildung 2** EAST - Hemmkurven der Phl p 5b - Mutanten mit dem Allergiker - Serumpool We 6/97

Inhibitoren:

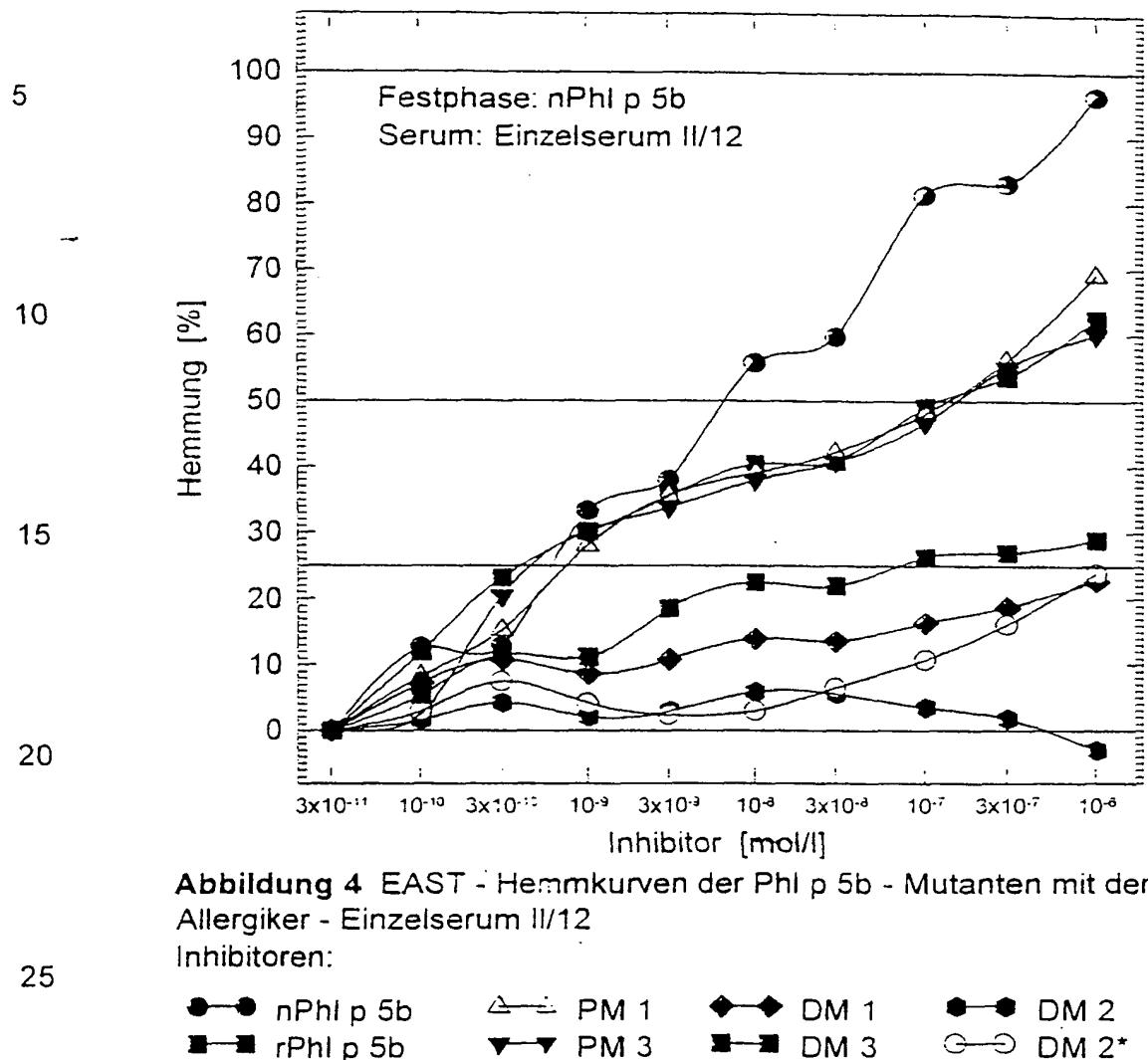
● nPhl p 5b	△ PM 1	◆ DM 1	● DM 2
■ rPhl p 5b	▼ PM 3	■ DM 3	○ DM 2*



30

35

- 37 -



**Abbildung 4** EAST - Hemmkurven der Phl p 5b - Mutanten mit dem Allergiker - Einzelserum II/12  
Inhibitoren:

25

30

35

- 38 -

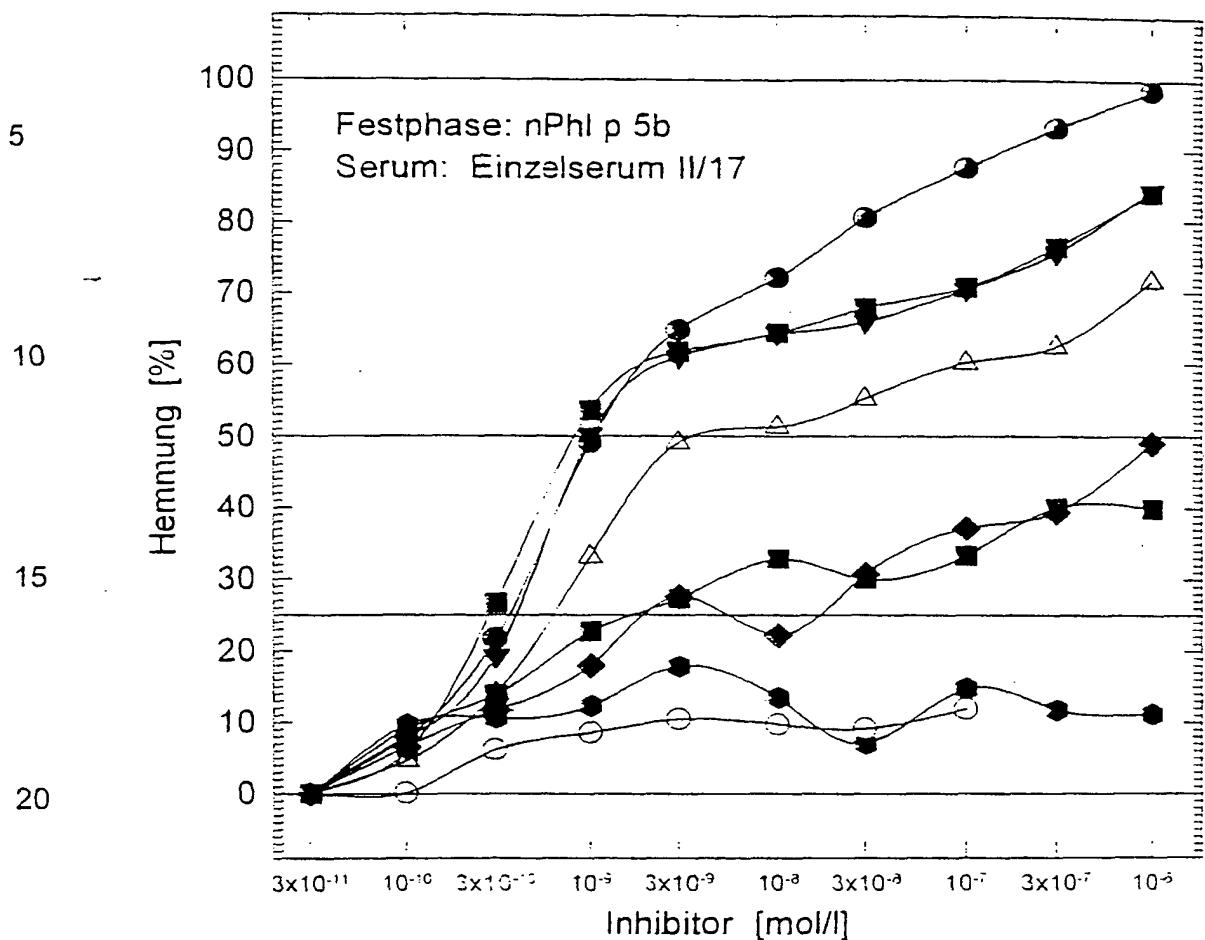


Abbildung 5 EAST - Hemmkurven der Phl p 5b - Mutanten mit dem  
Allergiker - Einzelserum II/17

Inhibitoren:

● ● nPhl p 5b	△ △ PM 1	◆ ◆ DM 1	● ● DM 2
■ ■ rPhl p 5b	▼ ▼ PM 3	■ ■ DM 3	○ ○ DM 2*

Tabelle 2:

Allergene Potenz ( $P_{rel.}$ ) der rekombinanten Phl p 5b-Mutanten im Vergleich zu rekombinantem und nativem Phl p 5b mit dem Allergiker-Serumpool Bor 18/100

5	Inhibitor	Hemmwert <sup>1</sup> [mol/l]		Allergene Potenz( $P_{rel.}$ ) <sup>2</sup>	
		25 %	50 %	25 %	50 %
10	n Phl p 5b	$3,3 \times 10^{-10}$	$4,2 \times 10^{-9}$	1,000	1,000
	r Phl p 5b	$2,0 \times 10^{-10}$	$5,0 \times 10^{-9}$	1,709	0,8410
15	PM1	$4,5 \times 10^{-10}$	$1,2 \times 10^{-8}$	0,739	0,3490
	PM3	$2,0 \times 10^{-10}$	$4,8 \times 10^{-9}$	1,641	0,8640
20	DM1	$8,6 \times 10^{-9}$	$2,8 \times 10^{-8}$	0,039	0,0015
	DM2	$8,3 \times 10^{13}$	$2,3 \times 10^{38}$	$4,0 \times 10^{-23}$	$1,8 \times 10^{-45}$
	DM3	$1,2 \times 10^{-8}$	$4,1 \times 10^{-5}$	0,028	0,0001
	DM2*	$5,0 \times 10^{23}$	$2,3 \times 10^{66}$	$6,7 \times 10^{-34}$	$2,0 \times 10^{-75}$

<sup>1</sup>Hemmwerthe: Konzentrationen d. Inhibitoren bei 25% bzw. 50% Hemmung

<sup>2</sup>Allergene Potenz: relativ zu natürlichem Phl p 5b bei 25% bzw. 50% Hemmung

25

30

35

Tabelle 3:

Allergene Potenz ( $P_{rel.}$ ) der rekombinanten Phl p 5b-Mutanten im Vergleich zu rekombinantem und nativem Phl p 5b mit dem Allergiker-Serumpool WE 6/97

5	Inhibitor	Hemmwert <sup>1</sup> [mol/l]		Allergene Potenz( $P_{rel.}$ ) <sup>2</sup>	
		25 %	50 %	25 %	50 %
	n Phl p 5b	$5,1 \times 10^{-10}$	$6,1 \times 10^{-9}$	1,000	1,000
10	r Phl p 5b	$3,0 \times 10^{-10}$	$1,4 \times 10^{-8}$	1,697	0,4400
	PM1	$1,2 \times 10^{-9}$	$1,2 \times 10^{-7}$	0,415	0,0510
	PM3	$8,3 \times 10^{-10}$	$3,0 \times 10^{-8}$	0,611	0,2030
15	DM1	$2,3 \times 10^{-8}$	$1,7 \times 10^{-5}$	0,022	0,0004
	DM2	$1,9 \times 10^{-8}$	$2,7 \times 10^{-11}$	$2,6 \times 10^{-15}$	$2,3 \times 10^{-30}$
	DM3	$5,1 \times 10^{-9}$	$2,9 \times 10^{-8}$	0,099	0,0020
20	DM2*	$4,6 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{-3}$	0,001	$4,0 \times 10^{-8}$

<sup>1</sup>Hemmwerte: Konzentrationen d. Inhibitoren bei 25% bzw. 50% Hemmung

<sup>2</sup>Allergene Potenz: relativ zu nativem Phl p 5b bei 25% bzw. 50% Hemmung

25

30

35

Tabelle 4:

Allergene Potenz ( $P_{rel.}$ ) der rekombinanten Phl p 5b-Mutanten im Vergleich zu rekombinantem und nativem Phl p 5b mit dem Allergiker-Einzelserum II/3

	Inhibitor	Hemmwert <sup>1</sup> [mol/l]		Allergene Potenz( $P_{rel.}$ ) <sup>2</sup>	
		25 %	50 %	25 %	50 %
10	n Phl p 5b	$5,1 \times 10^{-10}$	$5,9 \times 10^{-9}$	1,000	1,000
	r Phl p 5b	$5,6 \times 10^{-10}$	$1,4 \times 10^{-8}$	0,9030	0,4190
15	PM1	$8,6 \times 10^{-10}$	$1,9 \times 10^{-8}$	0,5950	0,3140
	PM3	$5,5 \times 10^{-10}$	$1,5 \times 10^{-8}$	0,9220	0,3990
20	DM1	$1,2 \times 10^{-8}$	$1,7 \times 10^{-8}$	0,0420	0,0035
	DM2	$6,6 \times 10^{10}$	$5,2 \times 10^{27}$	$7,7 \times 10^{-20}$	$1,1 \times 10^{-38}$
25	DM3	$1,1 \times 10^{-6}$	0,032	0,0004	$1,8 \times 10^{-7}$
	DM2*	$2,1 \times 10^{-6}$	0,010	0,0002	$5,9 \times 10^{-7}$

<sup>1</sup>Hemmwerde: Konzentrationen d. Inhibitoren bei 25% bzw. 50% Hemmung

<sup>2</sup>Allergene Potenz: relativ zu nativem Phl p 5b bei 25% bzw. 50% Hemmung

25

30

35

Tabelle 5:

Allergene Potenz ( $P_{rel.}$ ) der rekombinanten Phl p 5b-Mutanten im Vergleich zu rekombinantem und nativem Phl p 5b mit dem Allergiker-Einzelserum II/12

5	Inhibitor	Hemmwert <sup>1</sup> [mol/l]		Allergene Potenz( $P_{rel.}$ ) <sup>2</sup>	
		25 %	50 %	25 %	50 %
10	n Phl p 5b	$5,2 \times 10^{-10}$	$6,8 \times 10^{-9}$	1,000	1,000
	r Phl p 5b	$8,7 \times 10^{-10}$	$7,3 \times 10^{-8}$	0,597	0,093
15	PM1	$1,3 \times 10^{-9}$	$8,3 \times 10^{-8}$	0,391	0,082
	PM3	$1,3 \times 10^{-9}$	$9,1 \times 10^{-8}$	0,389	0,075
	DM1	$1,5 \times 10^{-5}$	68,0	$3,4 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-10}$
20	DM2	$3,8 \times 10^{10}$	$4,4 \times 10^{30}$	$1,4 \times 10^{-19}$	$1,6 \times 10^{-39}$
	DM3	$4,5 \times 10^{-8}$	0,0001	0,012	$5,7 \times 10^{-5}$
	DM2*	196,0	$7,4 \times 10^{14}$	$2,6 \times 10^{-12}$	$9,2 \times 10^{-25}$

<sup>1</sup>Hemmwerthe: Konzentrationen d. Inhibitoren bei 25% bzw. 50% Hemmung

<sup>2</sup>Allergene Potenz: relativ zu nativem Phl p 5b bei 25% bzw. 50% Hemmung

25

30

35

Tabelle 6:

Allergene Potenz ( $P_{rel.}$ ) der rekombinanten Phl p 5b-Mutanten im Vergleich zu rekombinantem und nativem Phl p 5b mit dem Allergiker-Einzelserum II/17

	Inhibitor	Hemmwert <sup>1</sup> [mol/l]		Allergene Potenz( $P_{rel.}$ ) <sup>2</sup>	
		25 %	50 %	25 %	50 %
10	n Phl p 5b	$2,2 \times 10^{-10}$	$2,6 \times 10^{-9}$	1,000	1,000
	r Phl p 5b	$2,1 \times 10^{-10}$	$4,7 \times 10^{-9}$	1,045	0,5450
15	PM1	$6,4 \times 10^{-10}$	$2,2 \times 10^{-8}$	0,336	0,1190
	PM3	$2,5 \times 10^{-10}$	$5,5 \times 10^{-9}$	0,855	0,4680
	DM1	$6,5 \times 10^{-9}$	$2,0 \times 10^{-8}$	0,033	0,0010
20	DM2	73,9	$6,4 \times 10^{-19}$	$2,9 \times 10^{-12}$	$4,1 \times 10^{-29}$
	DM3	$5,6 \times 10^{-9}$	$5,0 \times 10^{-8}$	0,038	0,0005
25	DM2*	0,0004	11675,0	$5,3 \times 10^{-7}$	$2,2 \times 10^{-13}$

<sup>1</sup>Hemmwerde: Konzentrationen d. Inhibitoren bei 25% bzw. 50% Hemmung

<sup>2</sup>Allergene Potenz: relativ zu nativem Phl p 5b bei 25% bzw. 50% Hemmung

### Beispiel 5

#### 30 Reduzierte Histaminfreisetzung von Basophilen durch die rPhl p 5b-Mutanten

35 Die hergestellte Punktmutante PM3 und die Deletionsmutanten DM1, DM2, DM2\* und DM3 wurden auf ihre Fähigkeit, Histamin aus Basophilen freizusetzen, überprüft und mit dem Wildtyp rPhl p 5b verglichen.

Vor dem Histaminfreisetzungstest wurden zunächst die basophilen Leukozyten aus dem EDTA-Blut eines Allergikers (PS-W) über eine Dextran-Sedimentation angereichert und dann auf eine Endkonzentration von 100.000 Basophilen/ml eingestellt. Zur Freisetzung von Histamin aus den Basophilen wurden jeweils 200 µl der Zellsuspension mit 50 µl Antigenlösung 40 min. bei 37°C inkubiert. Dazu wurde das rPhl p 5b und die Mutanten in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (von  $10^{-5}$  -  $10^{-12}$  M). Das freigesetzte Histamin wurde in den jeweiligen Überständen mit Hilfe des Methyl-Histamin-RIA der Fa. Pharmacia nach der Vorschrift des Herstellers bestimmt.

Alle untersuchten rekombinanten Proteine beschrieben im Histaminfreisetzungstest mit zunehmender Konzentration die typische Glockenkurve (Abb. 6). Im Vergleich zum Wildtyp rPhl p 5b zeigte die Punktmutante keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer Fähigkeit, Histamin freizusetzen. Für die Deletionsmutanten DM3, DM1 bzw. DM2 ergab sich, bei Bezug auf die Konzentration, die eine 30%ige Histaminfreisetzung bewirkt, eine Reduktion um das 3-, 20-, bzw. 500-fache. Die Deletionsmutanten zeigen also eindeutig ein verminderteres Vermögen, Histamin aus Basophilen freizusetzen.

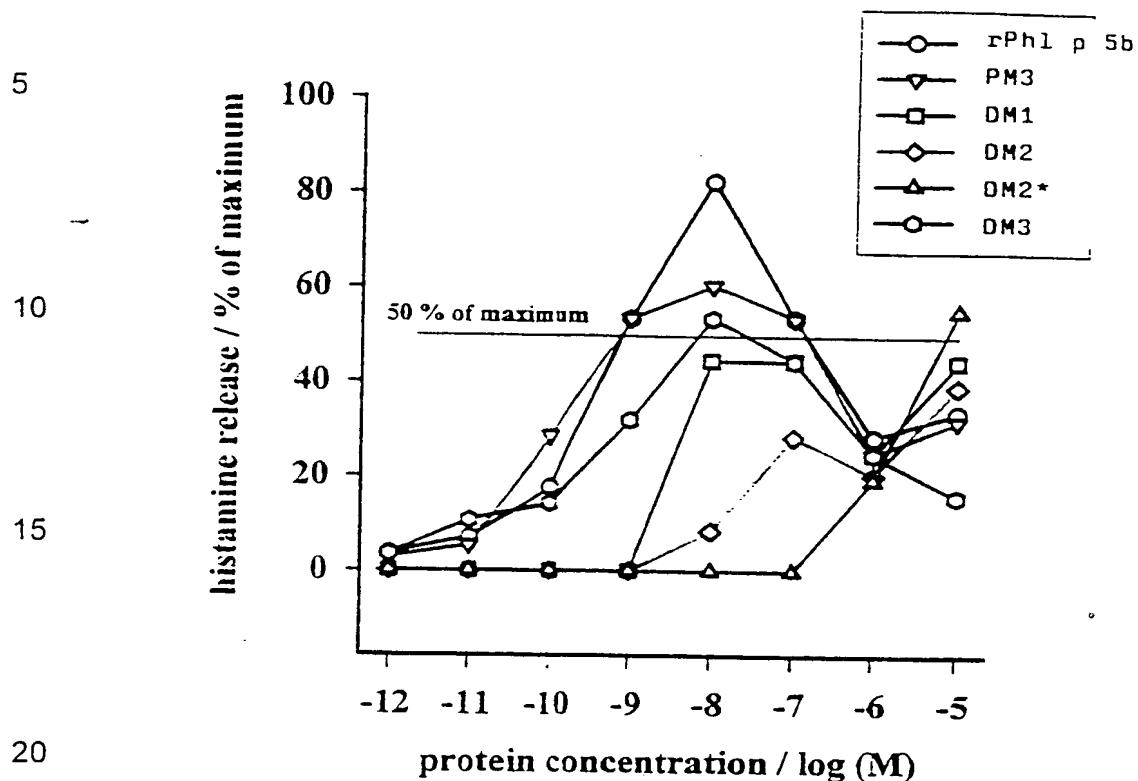
25

30

35

- 45 -

Abb. 6 Histaminfreisetzung von humanen Basophilen nach Reaktion mit den Allergenen und Allergenmutanten



Beispiel 6

25 **Nachweis der Reaktivität von rekombinanten Phl p 5b-Mutanten mit T-Zell-Klonen von Graspollenallergikern**

30 Die Reaktivität der rekombinanten Phl p 5b-Mutanten wurde an etablierten T-Zell-Klonen (TCC) mit bekannter Spezifität getestet. Die TCC stammen von Graspollen-Allergikern (s. Bsp. 1) und sind gegen die T-Zell-reaktiven Bereiche A (Abb. 7), B (Abb. 8) und C (Abb. 9) gerichtet. Die T-Zellreaktivität wurde durch die Stimulierung der Klone zur Proliferation gemessen. 35 Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß die TCC mit den Phl p 5b-Mutanten spezifisch reagieren, wenn der entsprechende Epitop unverändert ist und zeigen erwartungsgemäß keine Reaktion, wenn der Epitop fehlt oder durch eine Punktmutation verändert ist.

Abb. 7: Proliferative Reaktion von Phl p 5b-reaktiven T-Zell-Klonen (TCC) von Allergikern mit rPhl p 5b-Mutanten

Spezifität: Immundominanter T-Zell-reaktiver Bereich A

Stimulator <sup>1)</sup>	Epitop vorhanden	[ <sup>3</sup> H]-Thymidineinbau in TCC <sup>2)</sup>			
		JR 15	JR 13	CB 14	CB 2
Medium	-	-	-	-	-
n Phl p5	+	+++	+++	+++	+++
r Phl p5a	(±)	-	-	+	+
r Phl p5b	+	+++	+++	+++	+++
PM1	+	++	+++	+++	+++
PM3	+	+++	+++	+++	+++
DM1	+	+++	++	++	++
DM2	+	+++	++	ng <sup>3)</sup>	ng
DM2*	-	-	-	-	-
DM3	+	+++	++	ng	ng
PL (12mer)	+	+++	+++	+++	+++

30

<sup>1</sup> Endkonzentration 0,3 µM

<sup>2</sup> Stimulationsindex SI: < 1(-), 1-2 (+), 2-5(+), 5-10 (++) > 10 (+++)

<sup>3</sup> n.g.: nicht getestet

35

Abb. 8: Proliferative Reaktion von Phl p 5b-reaktiven T-Zell-Klonen (TCC) von Allergikern mit rPhl p 5b-Mutanten

Spezifität: Immundominanter T-Zell-reaktiver Bereich B

Stimulator <sup>1)</sup>	Epitop vorhanden	[ <sup>3</sup> H]-Thymidineinbau <sup>2)</sup> in TCC	
		UZH2	DW8
Medium	-	-	-
n Phl p5	+	+++	+++
r Phl p5a	(±)	±	+++
r Phl p5b	÷	+++	+
PM1	+	+++	+
PM3	+	+++	±
DM1	÷	+++	+
DM2	-	-	-
DM2*	-	-	-
DM3	+	+++	+
PL (12mer)	÷	+++	+++

<sup>1</sup> Endkonzentration 0.3 µM

<sup>2</sup> Stimulationsindex SI: < 1(-), 1-2 (+), 2-5(++) 5-10 (+++), > 10 (++++)

<sup>3</sup> n.g.: nicht getestet

Abb. 9: Proliferative Reaktion des Phl p 5b-reaktiven T-Zell-Klonen (TCC)  
von Allergikern mit rPhl p 5b-Mutanten

Spezifität: Immundominanter T-Zell-reaktiver Bereich C

Stimulator <sup>1)</sup>	Epitop unverändert vorhanden	[ <sup>3</sup> H]-Thymidineinbau <sup>2)</sup>			
		1. Exp.	2. Exp.	3. Exp.	
Medium	-	1	1	1	-
n Phl p5	+	11,2	8,2	4,5	++
r Phl p5a	-	ng	<1	<1	-
r Phl p5b	+	11,0	7,0	5,5	++
PM1	-	<1	<1	1,1	-
PM3	+	7,4	5,9	4,5	++
DM1	+	8,6	6,2	4,4	++
DM2	+	14,4	9,1	7,1	+++
DM2*	+	12,8	12,1	11,7	+++
DM3	+	9,8	6,9	4,4	++
PL (12mer)	+	20,9	16,7	ng <sup>3)</sup>	+++

<sup>1</sup> Endkonzentration 0,3 µM

<sup>2</sup> Stimulationsindex SI: < 1(-), 1-2 (+), 2-5(+), 5-10 (++) > 10 (+++)

<sup>3</sup> n.g.: nicht getestet

Beispiel 7**Testung der Reaktivität von rekombinanten PhI p 5b-Mutanten mit T-Zell-Linien von Graspollenallergikern**

5

Von 8 Graspollenallergikern (s. Bsp. 1) wurden die oligoklonalen T-Zell-Linien (TCL) durch wiederholte Aktivierung mit natürlichem PhI p 5b (a + b) oder rekombinantern rPhI p 5b bzw. 5a + 5b angelegt.

10

Diese TCL wurden mit den rPhI p 5b-Mutanten auf ihre proliferative Reaktion getestet (Abb. 10). Dabei zeigt sich, daß alle Mutanten die TCL aktivieren, wobei jedoch quantitative Unterschiede bestehen. Die Deletionsmutante DM3 zeigt bei den meisten TCL eine starke spezifische 15 Stimulierung.

20

25

30

35

- 50 -

Abb. 10: Proliferative Reaktion des Phl p 5b-reaktiven T-Zell-Linien (TCL)  
von Allergikern mit rPhl p 5b-Mutanten

TCL	[ <sup>3</sup> H] - Thymidineinbau in TCL <sup>2</sup>							
	1 Wöl	2 Eic	3 Fre	4 Mer	5 Mah	6 r Phl p 5	7 r Phl p 5a	8 r Phl p 5b
Prinzipieller Stimulator	n Phl p 5	n Phl p 5	n Phl p 5	n Phl p 5	n Phl p 5	n Phl p 5	n Phl p 5	n Phl p 5
Sekundärer Aktivator <sup>1</sup>								
n Phl p 5	+++	+++	++	+++	++	++	++	+
r Phl p 5a	-	+	+	+	+	+	n.g. <sup>3</sup>	n.g.
r Phl p 5b	+	+	+	+	+	+++	++	+++
PM1	+	±	+	±	+	+	+	+++
PM3	±	±	+	+	±	+	++	+
DM1	±	+	+	+	+	+	+++	+++
DM2	±	+	+	+++	++	+	++	++
DM2*	±	+	+	++	++	+	+	±
DM3	±	+	+++	++	+++	++	++	+++

<sup>1</sup> Endkonzentration 0,3 µM<sup>2</sup> Stimulationsindex SI: < 1(-), 1-2 (+), 2-5 (++) 5-10 (+++), > 10 (++++)<sup>3</sup> n.g.: nicht getestet

## Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse gemäß der Beispiele 1 - 7

Die Kartierung der von den T-Helferzellen von Graspollen-Allergikern erkannten Epitope des Phl p 5b-Hauptallergens hat gezeigt, daß die T-Zell-Epitope der individuellen T-Zell-Klone (TCL) über die gesamte Sequenz des Phl p 5b verteilt sind. Es lassen sich jedoch unschwer **3 immundominante T-Zell-reaktive Bereiche** erkennen, die von 85% der TCC erkannt werden (Beispiel 1). Durch Punktmutationen (Beispiel 2) und Deletionsmutationen (Beispiel 3) konnten rekombinante Phl p 5b-Mutanten erzeugt werden. Die Punktmutanten (PM1 und PM3) unterscheiden sich hinsichtlich ihrer IgE-Reaktivität, gemessen im EAST-Hemmttest (Beispiel 4), nur unwesentlich vom Wildtyp Phl p 5b. Die IgE-Reaktivität der Deletionsmutanten DM1 und DM3 ist stark reduziert, aber noch nachweisbar. Demgegenüber ist die IgE-Bindung der Mutanten DM2 und DM2\* extrem stark reduziert. Diese graduelle Abnahme der Allergenität der rPhl p 5b-Mutanten wird auch durch den Histamin-Freisetzungstest mit Spez. IgE beladenen Basophilen aus dem Blut von Allergikern bestätigt (Beispiel 5). Die Prüfung der rPhl p 5b-Mutanten mit Epitop-kartierten T-Zell-Klonen bestätigt, daß die Punkt- und Deletionsmutationen in der erwarteten Weise mit dem TCC reagieren oder die Stimulierung nicht erfolgt (Beispiel 6). An oligoklonalen T-Zell-Linien, die aus dem Blut von Graspollenallergikern durch Stimulierung mit Phl p 5 angelegt wurden, konnte gezeigt werden, daß die Mutanten zu einer Stimulierung solcher oligoklonalen TCL fähig sind (Beispiel 7). Faßt man die Ergebnisse der Reduzierung der Allergenität und den Erhalt der T-Zell-Stimulierung zusammen, so stellen die Mutanten, besonders die Deletionsmutanten, rekombinante Allergenvarianten dar, die prospektiv zur spezifischen Immuntherapie geeignet sind.

30

35

Die nachfolgenden Beispiele betreffen pharmazeutische Zubereitungen:

**Beispiel A: Injektionsgläser**

5 Eine Lösung von 100 g eines Wirkstoffes oder Wirkstoffgemisches auf Basis der modifizierten rekombinanten Allergene und 5 g Dinatriumhydrogenphosphat wird in 3 l zweifach destilliertem Wasser mit 2 n Salzsäure auf pH 6,5 eingestellt, steril filtriert, in Injektionsgläser abgefüllt, unter sterilen Bedingungen lyophilisiert und steril verschlossen. Jedes Injektionsglas enthält 5 mg Wirkstoff.

10

**Beispiel B: Suppositorien**

15 Man schmilzt ein Gemisch von 20 g eines Wirkstoffes in Form der modifizierten rekombinanten Allergene mit 100 g Sojalecithin und 1400 g Kakaobutter, gießt in Formen und lässt erkalten. Jedes Suppositorium enthält 20 mg Wirkstoff.

**Beispiel C: Lösung**

20 Man bereitet eine Lösung aus 1 g eines Wirkstoffes in Form der modifizierten rekombinanten Allergene, 9,38 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 28,48 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  und 0,1 g Benzalkoniumchlorid in 940 ml zweifach destilliertem Wasser. Man stellt auf pH 6,8 ein, füllt auf 1 l auf und

25 sterilisiert durch Bestrahlung. Diese Lösung kann in Form von Augentropfen verwendet werden.

**Beispiel D: Salbe**

30 Man mischt 500 mg eines Wirkstoffes in Form der modifizierten rekombinanten Allergene mit 99,5 g Vaseline unter aseptischen Bedingungen.

**Beispiel E: Tabletten**

Ein Gemisch von 1 kg Wirkstoff in Form der modifizierten rekombinanten Allergene, 4 kg Lactose, 1.2 kg Kartoffelstärke, 0,2 kg Talk und 0,1 kg 5 Magnesiumstearat wird in üblicher Weise zu Tabletten verpreßt, derart, daß jede Tablette 10 mg Wirkstoff enthält.

**Beispiel F: Dragees**

10 Analog Beispiel E werden Tabletten gepreßt, die anschließend in üblicher Weise mit einem Überzug aus Saccharose, Kartoffelstärke, Talk, Tragant und Farbstoff überzogen werden.

**Beispiel G: Kapseln**

15 2 kg Wirkstoff in Form der modifizierten rekombinanten Allergene werden in üblicher Weise in Hartgelatinekapseln gefüllt, so daß jede Kapsel 20 mg des Wirkstoffs enthält.

**Beispiel H: Ampullen**

20 Eine Lösung von 1 kg Wirkstoff in Form der modifizierten rekombinanten Allergene in 60 l zweifach destilliertem Wasser wird steril filtriert, in 25 Ampullen abgefüllt, unter sterilen Bedingungen lyophilisiert und steril verschlossen. Jede Ampulle enthält 10 mg Wirkstoff.

**Beispiel I: Inhalations-Spray**

30 Man löst 14 g Wirkstoff in Form der modifizierten rekombinanten Allergene in 10 l isotonischer NaCl-Lösung und füllt die Lösung in handelsübliche Sprühgefäße mit Pump-Mechanismus. Die Lösung kann in Mund oder Nase gesprührt werden. Ein Sprühstoß (etwa 0,1 ml) entspricht einer Dosis von etwa 0,14 mg.

**Patentansprüche**

1. Modifizierte rekombinante Allergene (mrA) abgeleitet von Allergenen, die durch Extraktion aus natürlichen Rohstoffen gewonnen werden können und/oder ihre physiologischen unbedenklichen Salze oder Solvate.  
5
2. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß diese von den Hauptallergenen der Gruppen 1-6 abgeleitet werden.  
10
3. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktivität mit IgE-Antikörpern von Graspollenallergikern eliminiert oder reduziert ist, wobei die Reaktivität mit T-Lymphozyten weiterhin erhalten ist.  
15
4. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene der Allergene durch gentechnische Verfahren so modifiziert werden, daß die von ihnen codierten Polypeptide Austausche, Deletionen und/oder Additionen einzelner oder mehrerer Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.  
20
5. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß dominierende T-Zell-reaktive Bereiche (T-Zell-Epitope) von den Allergenen nicht gentechnisch verändert werden.  
25
6. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß diese von Hauptallergenen der Gruppe 5 abgeleitet werden.  
30
- 35

7. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß diese von dem Hauptallergen Phl p 5b abstammen.
- 5 8. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer oder eine Kombinationen der Bereiche 16-42, 135-149 und 180-206 des aus insgesamt 265 Aminosäuren bestehenden Phl p 5b-Polypeptides nicht verändert werden.
- 10 9. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß Anspruch 8, ausgewählt aus der folgenden Gruppe von Polypeptiden  
PM ( $N^{32} \rightarrow D$ ,  $D^{49} \rightarrow L$ ,  $K^{50} \rightarrow A$ )  
PM2 ( $D^{49} \rightarrow L$ ,  $K^{50} \rightarrow A$ )  
PM3 ( $A^{13} \rightarrow C$ )  
DM1 ( $\Delta K^{50} \rightarrow P^{32}$ ,  $D^{49} \rightarrow L$ )  
DM 2 ( $\Delta F^{51} - G^{178}$ ,  $D^{49} - L$ ,  $K^{50} - A$ )  
20 DM2\* ( $\Delta F^{51} - G^{178}$ , 179 – 217 veränderte Sequenz)  
DM3 ( $\Delta A^{154} - T^{177}$ ,  $A^{220} \rightarrow T$ )
- 15 10. Verfahren zur Herstellung von modifizierte rekombinante Allergene gemäß der Ansprüche 1 bis 9 und/oder ihrer physiologischen unbedenklichen Salze oder Solvate, dadurch gekennzeichnet, daß verschiedene Varianten der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet werden.
- 25 30 11. Pharmazeutische Zubereitung enthaltend ein oder mehrere modifizierte rekombinante Allergene gemäß der Ansprüche 1-9 und/oder eines ihrer physiologischen unbedenklichen Salze oder Solvate sowie gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur Behandlung von IgE-vermittelten Allergien.

12. Verfahren zur Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens ein modifiziertes rekombinantes Allergen gemäß der Ansprüche 1-9 und/oder eines ihrer physiologischen unbedenklichen Salze oder Solvate zusammen mit mindestens einem festen, flüssigen oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff in eine geeignete Dosierungsform bringt.  
5
13. Verwendung der modifizierten rekombinanten Allergene und/oder eines ihrer physiologischen unbedenklichen Salze oder Solvate gemäß der Ansprüche 1-9 zur Herstellung eines Arzneimittels zur immun-  
10 spezifischen Therapie (Hyposensibilisierung) von Allergien.
14. Verwendung der modifizierten rekombinanten Allergene gemäß der  
15 Ansprüche 1-9 zur immunspezifischen Therapie (Hyposensibilisierung) von Allergien.

20

25

30

35